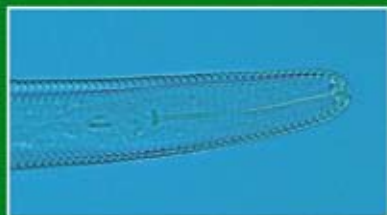
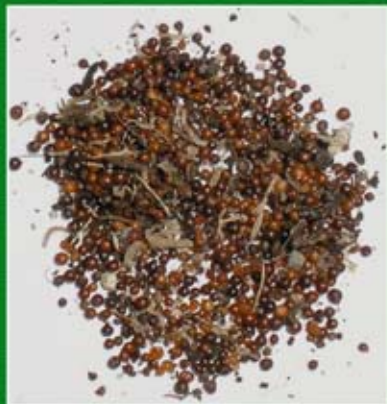


Е. М. Матвеева, А. А. Сущук,
Д. С. Калинкина, В. В. Займль-Бухингер

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД



Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
Институт биологии КарНЦ РАН

**Е. М. Матвеева, А. А. Сушук,
Д. С. Калинкина, В. В. Займль-Бухингер**

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

Учебно-методическое пособие

Петрозаводск
2018

УДК 632.651(075)
ББК 28.083я7
М54

Р е ц е н з е н т ы :

доктор биологических наук, профессор *Е. П. Иешко*
доктор биологических наук *С. В. Зиновьева*

*Работа выполнена и опубликована
за счет средств федерального бюджета на выполнение
государственного задания КарНЦ РАН (№ 0221-2017-0042)
и средств гранта РФФИ (№ 15-04-07675).*

Матвеева Е. М.

М54 Методические основы изучения фитопаразитических нематод: Учебно-методическое пособие / Е. М. Матвеева, А. А. Сушук, Д. С. Калинкина, В. В. Займль-Бухингер. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2018. – 61 с.: ил. 17, табл. 1. Библиогр. 58 назв.

ISBN 978-5-9274-0820-7

В учебно-методическом пособии представлена общая информация о фитопаразитических нематодах, обобщены сведения о методах отбора проб, выделения и идентификации таксонов нематод-паразитов растений. Представлены основные подходы к анализу и интерпретации полученных данных.

Для студентов, аспирантов и сотрудников научных учреждений биологического профиля.

УДК 632.651(075)
ББК 28.083я7

ISBN 978-5-9274-0820-7

© Матвеева Е. М., Сушук А. А., Калинкина Д. С.,
Займль-Бухингер В. В., 2018
© ФИЦ «Карельский научный центр РАН», 2018
© Институт биологии КарНЦ РАН, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД	7
Морфология фитопаразитических нематод	7
Классификация фитопаразитических нематод по способу/типу паразитирования	9
Влияние фитопаразитических нематод на растение-хозяина ..	12
Глава 2. МЕТОДИКА ОТБОРА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ	15
Отбор образцов для обнаружения фитопаразитических нематод, обитающих в почве	15
Отбор образцов для определения зараженности почвы и растений неподвижными формами (цистами) фитопаразитических нематод	17
Глава 3. МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕМАТОД ИЗ СУБСТРАТА, ФИКСАЦИИ МАТЕРИАЛА И ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОПРЕПАРАТОВ	19
Выделение подвижных форм нематод из почвы и растительной ткани. Вороночный метод Бермана	19
Выделение неподвижных форм нематод из почвы и растительных тканей	21
Фиксация нематод	25
Изготовление временных препаратов	26
Изготовление постоянных препаратов	26
Изготовление препаратов анально-вульварной области (терминального участка) цист	27

Глава 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕМАТОД	29
4.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД	29
Измерения фитопаразитических нематод и индексы, используемые при их диагностике	29
Идентификация цистообразующих нематод: изучение особенностей анально-вulварной области цист	31
4.2. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ РОДОВ НЕМАТОД ПОД БИНОКУЛЯРОМ	32
4.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД ..	34
Глава 5. ХРАНЕНИЕ, ОБРАБОТКА И ПЕРВИЧНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ	40
5.1. БАЗЫ ДАННЫХ. ЭЛЕКТРОННЫЙ АТЛАС ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ	40
5.2. ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИЕ НЕМАТОДЫ КАК ЧАСТЬ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД	42
Индекс зрелости и его модификации	46
5.3. ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАРАЖЕНИЯ ПОЧВЫ И РАСТЕНИЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩИМИ НЕМАТОДАМИ	48
Оценка пространственного распределения нематоды	49
Выбор мероприятий по ограничению численности нематоды	51
Оценка эффективности способов по ограничению численности нематоды	51
Анализ динамики численности нематоды	53
Оценка устойчивости растений к заражению	53
ПОСЛЕСЛОВИЕ	55
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	58

ВВЕДЕНИЕ

Изучение функционирования организмов в условиях глобальных климатических изменений и антропогенных воздействий наиболее актуально в условиях Севера, где неблагоприятные, вплоть до экстремальных, природно-климатические условия часто сочетаются с более выраженными (по сравнению с другими регионами) негативными последствиями антропогенной трансформации экосистем.

Для такого рода исследований удобно использовать в качестве модельных объектов почвенных нематод, микроскопических круглых червей, представителей педобионтов, многочисленных и разнообразных среди Metazoa в северных экосистемах. Удобство нематод как тест-объектов состояния среды обитания определяется их повсеместным распространением, высоким разнообразием и плотностью популяций. Нематод можно обнаружить в почвах разных типов – от сыпучих песков до тундр, от горячих источников до вечной мерзлоты.

К настоящему времени науке известно почти 25 тыс. видов нематод, из них 12 тыс. видов – паразиты животных, около 2 тыс. видов являются облигатными паразитами растений, около 6 тыс. видов – свободноживущие почвенные нематоды, 4–5 тыс. видов – свободноживущие морские нематоды (Чесунов, 2006; Andrassy, 1992). Большинство паразитических нематод принадлежит к отряду Tylenchida, насчитывающему 2250 видов, входящих в 200 родов (Siddiqi, 2000). В Республике Карелия обнаружено более 300 видов почвообитающих нематод (Соловьева и др., 1976; Груздева и др., 2011); на долю нематод, трофически связанных с растениями, приходится около 20 % фауны.

Фитопаразиты как комплекс нематод ризосферы растений являются недостаточно изученной, но важной в практическом отношении группой, отдельные представители которой – объекты внутреннего и внешнего карантина. Эти виды обладают высокой вредоносностью, тенденцией к расширению ареала в условиях возрастающего антропогенного пресса, паразитируют практически на всех известных видах растений, в том числе на важнейших сельскохозяйственных культурах, приносят значительный ущерб сельскому и лесному хозяйству Российской Федерации. Известно, что они являются причиной снижения урожая сельскохозяйственных культур, ухудшения его качества. Часто нематодная инвазия усугубляется действием сопутствующих патогенных микроорганизмов – бактерий, вирусов, грибов.

Основная цель настоящего учебно-методического пособия – ознакомление студентов и аспирантов с основными методами исследования фитопаразитических нематод, наиболее широко применяемыми в фитонематологии как в полевых, так и в лабораторных условиях. Кроме того, в пособии обобщены и представлены в кратком виде сведения о фитопаразитических нематодах в целом, основные подходы к обработке и первичному анализу полученных нематологических данных. Информация, изложенная в пособии, может быть полезна и востребована сельхозпроизводителями и фермерами, занятыми в сфере картофелеводства, и владельцами дачных участков.

Глава 1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

Фитопаразитические нематоды – облигатные паразиты, питающиеся содержимым живых клеток растений и наносящие механические повреждения растительным тканям. Они различаются между собой по степени проникновения в органы растения и классифицируются в определенные группы: от эктопаразитов до седентарных эндопаразитов, что обуславливает уровень их специализации по хозяину и вредоносность для растений. Подавляющее большинство паразитических нематод относятся к отряду Tylenchida.

Морфология фитопаразитических нематод

Нематоды – простые по строению организмы, имеющие веретеновидное, цилиндрическое, несегментированное, круглое в поперечном сечении тело. Размеры нематод варьируют от 0,3 мм до 8 мм, обычно около 1 мм или менее. Снаружи тело покрыто кутикулой, ее поверхность может быть гладкой или кольчатой. Изнутри кутикула подстиляется гиподермой и мышечным слоем, которые совместно обеспечивают движение нематоды. Это кожно-мускульный мешок. Нервная система ортогонального типа: нервные стволы, идущие вдоль тела, соединенные между собой перемышками (комиссурами). Пищеварительная система начинается ротовым отверстием, открывающим доступ в ротовую полость (стому). Стома у фитопаразитических нематод преобразована в стилет. Далее – пищевод, средняя и задняя кишка (ректум), которая заканчивается анусом. Органы чувств: органы осязания (губные сосочки – папиллы) и химического чувства (амфиды и дейриды). Выделительная система представлена выделительными каналами, выделительной железой и выделительной порой.

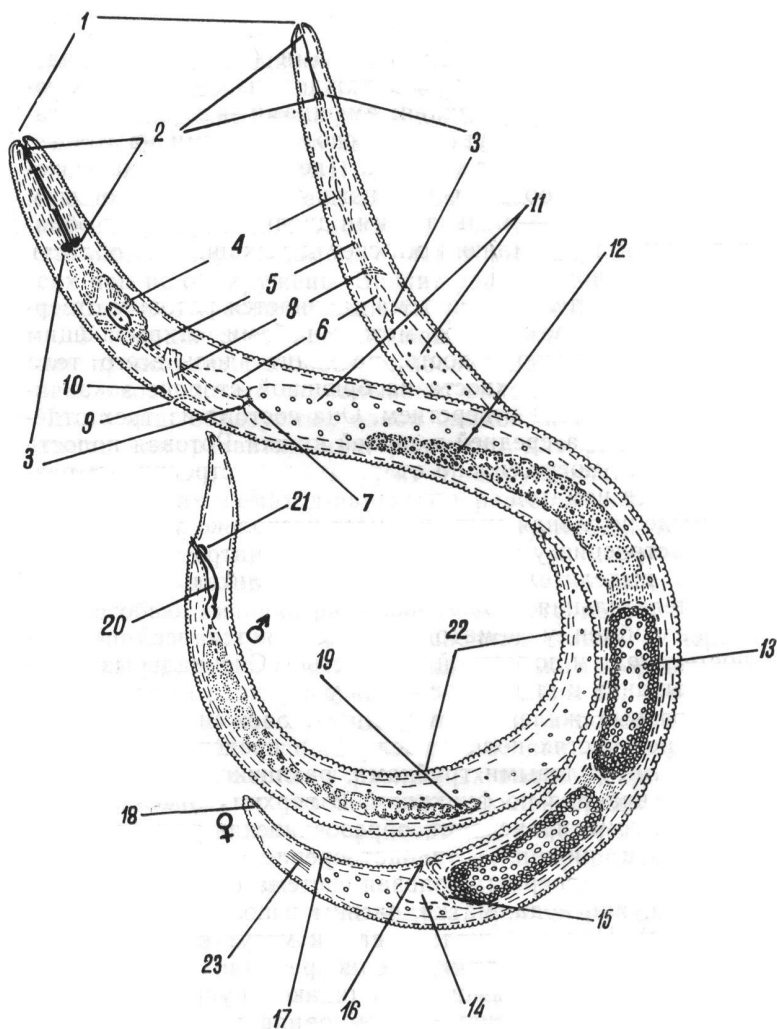


Рис. 1. Общее строение паразитической нематоды *Paratylenchus hamatus* (по: Соловьева, 1974):

1 – ротовое отверстие; 2 – стилет; 3 – пищевод; 4 – метакарпальный бульбус; 5 – истмус; 6 – кардиальный бульбус; 7 – пищеводно-кишечный клапан; 8 – нервное кольцо; 9 – выделительная пора; 10 – гемизонид; 11 – кишечник; 12 – яичник; 13 – яйцо; 14 – задняя матка; 15 – вагина; 16 – вульва; 17 – анус; 18 – хвост; 19 – семенник; 20 – спикула; 21 – рулек; 22 – кольчатая кутикула; 23 – боковое поле

Газообмен происходит всей поверхностью тела, а перераспределение веществ внутри тела – с участием полостной жидкости, заполняющей псевдоцель. Дыхательной и кровеносной систем нет. В подавляющем большинстве нематоды раздельнополы. Половая система самки состоит из яичника, яйцевода, матки, вагины, полового отверстия (вульвы). У самцов – 1 семенник, семенной пузырек, семяпровод, семяизвергательный канал, впадающий в клоаку. В клоаке расположены совокупительные органы – спиккулы. С помощью специальной мускулатуры они выдвигаются и удерживают самку при оплодотворении. Общий вид нематоды показан на рис. 1.

Классификация фитопаразитических нематод по способу/типу паразитирования

По способу паразитирования выделяют экто- и эндопаразитов (рис. 2). Эктопаразиты (*Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Geocenamus*, *Paratrichodorus*, *Longidorus* и др.) прокалывают ткань корня стилетом и погружают в него только головной конец. Половозрелые особи откладывают яйца в почву. Первую линьку личинки проходят в яйце, после чего выходят в почву. Личинка находит молодые корни растения-хозяина, прокалывает стилетом эпидермальные клетки и начинает питаться. Личинка проходит линьку дважды. За этот период она может свободно передвигаться от одного корешка к другому и менять места паразитирования. После последней линьки происходит дифференцировка на половозрелых самок или самцов. Многие эктопаразитические нематоды способны инвазировать широкий спектр растений. Специфичность в отношении растения-хозяина выражается только в различных темпах размножения. В зависимости от того, насколько пригодны в качестве хозяев имеющиеся поблизости растения, популяция нематод за короткий срок может как увеличиться в несколько раз, так и уменьшиться. В опытах с *Hemicycliophora parvana* показано, что к хозяевам, обеспечивающим интенсивное размножение нематоды с 200 до 12 600 особей за пять месяцев, относятся бобовые растения и кукуруза (Деккер, 1972). Согласно исследованиям на экспериментальных лугах, нематоды родов

Tylenchorhynchus, *Pratylenchus* и *Paratylenchus* предпочитают в качестве объектов питания травянистые растения, однако первые два из них достигали наибольшей численности на участке, засеянном тимopheевкой луговой *Phleum pratense* L., в то время как нематоды рода *Paratylenchus* были наиболее широко представлены в местах произрастания ежи сборной *Dactylis glomerata* L. (Viketoft et al., 2005). А виды *Helicotylenchus digonicus*, *H. pseudorobustus*, несмотря на широкую специфичность в отношении растений-хозяев, достигают высоких значений численности на корнях пшеницы, ячменя, гороха и оливкового дерева (Talavera, Jimenez, 1997).

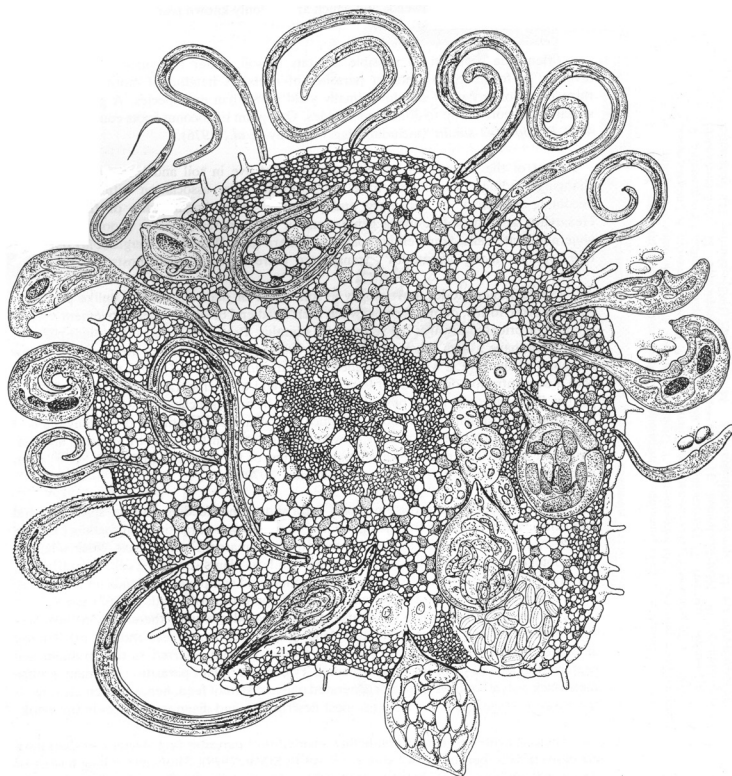


Рис. 2. Различные группы фитопаразитических нематод-тиленхид (эктопаразиты, мигрирующие эндопаразиты, седентарные эндопаразиты) и их приуроченность к тканям корней растений (по: Siddiqi, 1986)

Эндопаразитические нематоды полностью проникают в ткань растения-хозяина. Среди них различают мигрирующих и седентарных. Мигрирующие эндопаразиты проникают во внутренние ткани корня хозяина и на пути своего движения к другим органам (стебли, листья, реже цветки и семена) вызывают механическое повреждение клеток. В течение вегетации нематоды могут покидать одно растение и передвигаться к другому. Яйца в основном откладываются внутри корневой или попадают в почву. Первая линька проходит в яйце. Личинка II стадии после вылупления начинает питаться в корнях растений, где она трижды линяет и превращается во взрослую особь. К типичным мигрирующим нематодам относятся *Pratylenchus*, *Hirschmanniella*, стеблевые нематоды родов *Ditylenchus* и *Anguina*.

Седентарные (неподвижные, прикрепленные) нематоды принадлежат к числу наиболее опасных и экономически значимых паразитов сельскохозяйственных культур во всем мире. В круг растений-хозяев входят многие пищевые и кормовые культуры, в том числе зерновые, овощные, бобовые, а также декоративные и цветочные. Седентарные нематоды формируют сложные взаимоотношения со своими хозяевами, обеспечивая высокий уровень адаптации к корневому паразитизму, гарантированные условия питания и защиту для самок и их потомства от неблагоприятных факторов внешней среды, высокий потенциал размножения. К наиболее экономически важным седентарным паразитам относятся цистообразующие (пр. *Heterodera*, *Globodera*, *Punctodera*) и галловые (р. *Meloidogyne*) нематоды. Характерной особенностью седентарных нематод является формирование в конце жизненного цикла цист (цистообразующие нематоды) или галлов (галловые нематоды), заполненных яйцами с личинками первого возраста, что обеспечивает их выживание в неблагоприятных условиях окружающей среды до момента наступления следующего вегетационного периода у растения-хозяина (Соловьева и др., 1989; Матвеева, 2004). Вылупление личинок и проникновение их в корни растений происходит на ранних этапах онтогенеза хозяина, когда активно формируется корневая система и накапливается достаточное количество корневых выделений. После внедрения в корень личинки движутся вдоль проводящей системы, достигнув перицикла, теряют подвижность (становятся

седентарными) и формируют место питания – синцитий (цистообразующие нематоды) или «гигантские клетки» (галловые нематоды), обеспечивающее отток ассимилятов от растения к личинке. В корнях растения-хозяина нематода проходит все этапы развития (J2, J3, J4, самки и самцы) вплоть до формирования самок, в полости тела которых образуются яйца.

Влияние фитопаразитических нематод на растение-хозяина

В процессе паразитирования нематоды оказывают существенное влияние на физиологические и биохимические процессы растений, что негативно сказывается на их росте, развитии и продуктивности. Болезни растений, вызываемые нематодами, носят название нематодозы. Патология растительной ткани под действием паразитов складывается из механического повреждения и химического воздействия личинок при проникновении и питании с использованием растений в качестве пищевых ресурсов. Внешние признаки или симптомы поражения часто различимы невооруженным глазом и напрямую связаны со способом питания нематоды и образом жизни (рис. 3).

Общие симптомы поражения растений фитопаразитическими нематодами связаны с изменениями корневой системы, что ведет к нарушению водного баланса и минерального питания хозяина и, в свою очередь, отражается в целом на физиологических процессах растения. Так, наблюдаются утолщенные и укороченные кончики корней при поражении корней нематодами рода *Trichodorus*. При заражении цистообразующими нематодами рода *Globodera* корневая система растений становится короче, иногда приобретает коричневую окраску, характеризуется мочковатостью вследствие развития множества боковых корней. Эктопаразитические нематоды родов *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* и другие, питающиеся на поверхности корней растений, могут вызывать некрозы тканей корня, внешне выражающиеся в побурении омертвевших участков. Эндопаразитические нематоды рода *Pratylenchus* вызывают более глубокие и обширные некрозы ткани, в которой они питаются и размножаются, при этом на поверхности корней появляются темно-

коричневые пятна, так называемые «раны». Раны несколько меньшего размера наблюдаются при заражении растений нематодами из семейства *Criconematidae*. Инвазия растений нематодами приводит к уменьшению числа листьев, искривлению стеблей, угнетению роста, размера листовой пластины. Наблюдаются снижение процесса фотосинтеза, хлороз листьев, изменение водного обмена. Часть из известных видов триходорид и лонгидорид являются переносчиками карантинных вирусных инфекций растений – непо- и тобравирусов, которые приводят к различным деформациям, некрозам и другим изменениям надземных и подземных органов растений.



Рис. 3. Признаки поражения растений фитопаразитическими нематодами: А – сосна черная, пораженная *Bursaphelenchus xylophilus*; Б – листья смородины, пораженные НЕРО-вирусами, переносимыми нематодами семейства Longidoridae; В – растения капусты, пораженные *Heterodera schachtii*; Г – слева: корни томата, пораженные галловыми нематодами рода *Meloidogyne*, справа: здоровые корни; Д – некроз клубня картофеля, вызванный нематодами *Ditylenchus destructor* (фото по: Таболин и др., 2017)

В то же время существуют данные о положительном косвенном влиянии фитопаразитических нематод на качественные и количественные характеристики урожая сельскохозяйственных культур. Например, было показано, что виды рода *Paratylenchus* в малых количествах стимулируют рост корней и улучшают урожай (Siddiqi, 2000). Паразитируя на растениях определенного вида, нематоды могут также косвенно оказывать положительное влияние на другие растения: например, цистообразующая нематода *Heterodera trifoli*, питаясь на растениях клевера, повреждает покровные ткани корня и усиливает поток соединений азота в почву, которые потребляют другие виды трав растительного сообщества (Bardgett et al., 1999).

Глава 2

МЕТОДИКА ОТБОРА ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ

В природе почвенные нематоды распространены повсеместно, однако для фитопаразитических нематод характерно образование очагов различного размера, приуроченных к типичным биоценозам или участкам произрастания растения-хозяина. Численность нематод зависит от состава растительного покрова, структуры почвы, температуры и уровня влажности. Очаги с высокой численностью фитопаразитов могут быть обнаружены в естественных лесах, главным образом лиственных, и лугах. В агроценозах, характеризующихся более узким видовым составом растений-хозяев, произрастающих с высокой плотностью, численность определенных видов нематод, как правило, увеличивается (Кирьянова, Кралль, 1969; Фитопаразитические нематоды России, 2012).

В зависимости от целей исследования и возможных трудозатрат устанавливается маршрут, календарное время отбора и количество проб. В полевых условиях производится отбор образцов почвы или визуальный осмотр надземных частей (для выявления галлов, новообразований, повреждений и других внешних признаков поражения растения) и корневой системы растений (для обнаружения цист/галлов нематод на корнях).

Отбор образцов для обнаружения фитопаразитических нематод, обитающих в почве

Основа метода: почвенный бур, пакет «Zip-Lock», этикетка, ручка, полевой дневник, фотоаппарат, GPS-навигатор.

Отбор почвенных образцов производится методом множественных уколов в почву с использованием почвенного бура (рис. 4), совка, садовой лопатки и др.



Рис. 4. Вид отдельной почвенной пробы, взятой с помощью почвенного бура ($d = 2$ см)

Для отбора проб из разных сред (почва, донные отложения) используются различные виды пробоотборников (рис. 5).

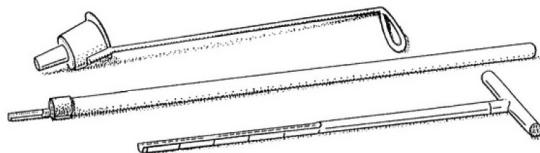


Рис. 5. Виды пробоотборников (по: van Bezooijen, 2006)

Количество образцов (биологических повторностей) из одного биоценоза, необходимых для полноценного анализа фауны почвенных нематод и выполнения статистической обработки данных, составляет в среднем от 5 до 10, масса/объем каждого из них 100 г/100 см³. Каждую повторность необходимо поместить в отдельный пакет «Zip-Lock». Данные о месте отбора пробы, т. е. название биоценоза, географические координаты, состав растительного покрова в пределах территории отбора проб, дате отбора заносятся в полевой дневник, отмечаются на этикетке к пробам, которую необходимо изолировать от соприкосновения с почвой во избежание ее увлажнения и последующего разложения. Кроме того, необходимо сделать фотографии места отбора проб для более детального рассмотрения в лабораторных условиях. В лаборатории до экстракции почвенные

пробы следует хранить в холодильнике при температуре 4 °С – в этих условиях нематоды сохраняют жизнеспособность в течение многих месяцев, однако плотность их популяций может существенно изменяться, поэтому выделение нематод из почвы следует проводить сразу или спустя несколько дней после отбора образцов.

Отбор образцов для определения зараженности почвы и растений неподвижными формами (цистами) фитопаразитических нематод

Среди фитопаразитических нематод с точки зрения методических основ отбора образцов и последующего их анализа особое место занимают седентарные эндопаразиты, в жизненном цикле которых сочетаются подвижная и неподвижная (седентарная) стадии. В данном пособии внимание сосредоточено на цистообразующих нематодах как одних из наиболее распространенных по всему миру облигатных седентарных паразитов. Особенность онтогенетического развития данных нематод заключается в формировании цист (жесткая темноокрашенная кутикула мертвой самки, содержащей яйца с личинками 1-го возраста) на завершающих этапах жизненного цикла. Цисты, находясь в почве в отсутствие растения-хозяина, сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени (10–15 лет). По количественным и качественным характеристикам цист можно судить о степени зараженности почвы и растений нематодой, что является более простым и менее затратным по времени способом по сравнению с определением подвижных форм (личинок нематод) в почве в ходе вегетации растений.

При проведении исследований в полевых условиях определяют пред- и постинфекционный уровень зараженности *почвы* цистами. Обследование участков проводят в весенне-осенний период. Поскольку для цистообразующих нематод характерно неравномерное распределение в пространстве (очаговое), отбор почвенных проб объемом по 5 см³ осуществляется с помощью пробоотборника с глубины 10–20 см зигзагообразно на расстоянии 1 м друг от друга по равномерной прямоугольной сетке. Крайние ряды располагают на расстоянии 0,5 м от границы участка. Каждые

50 проб соединяют в один средний образец почвы объемом в 250 см³, помещают в полиэтиленовый пакет, маркируют и вкладывают этикетку с датой и информацией о месте отбора.

Диагностика зараженности **растений** нематодой включает обследование растений на присутствие цист на корнях и отбор почвенных проб в ризосфере. Осмотр корней растений на выявление цист проводят во второй половине вегетации в сухую погоду. Предварительно регистрируют очаги пораженных растений на основе внешних проявлений нематодной инвазии – низкорослость растений, хлороз листьев, интенсивный листопад, увядание растений. Все подозрительные растения выкапывают, осторожно стряхивают с корней почву и осматривают их. На корнях можно обнаружить самок нематоды размером с маковое зерно разной степени зрелости, которые заметны невооруженным глазом или под лупой (рис. 6).



Рис. 6. Цисты *Globodera rostochiensis* разной спелости на корнях растений картофеля

Растения вместе с корневой системой помещают в полиэтиленовый пакет, маркируют и вкладывают этикетку с датой и местом отбора. Также проводится отбор почвы из прикорневой зоны пораженного растения для дальнейшего выделения цист. Отобранные пробы почв и растений доставляют в лабораторию для последующего определения количества цист нематоды.

Глава 3

МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕМАТОД ИЗ СУБСТРАТА, ФИКСАЦИИ МАТЕРИАЛА И ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОПРЕПАРАТОВ

Выделение подвижных форм нематод из почвы и растительной ткани. Вороночный метод Бермана

В лабораторных условиях проводится анализ почвенных образцов. Для выделения подвижных форм нематод из почвы или растительной ткани используют модифицированный вороночный метод Бермана.

Основа метода: воронка, сито с газовой тканью (размер ячеек 150–250 мкм), пластиковая или стеклянная пробирка (например, объемом 5 мл), соединительная резиновая трубка, держатель для воронки – штатив.

Эффективность метода Бермана основана на подвижности живых нематод, позволяющей отделить их от частиц субстрата. Нижний узкий конец воронки (рис. 7) соединяется с пробиркой резиновой трубкой, воронка заполняется водой и ставится в специальный держатель. Подготавливается сито: на газовую ткань кладется бумажный фильтр, в качестве которого может выступить один слой трехслойной бумажной салфетки, на который насыпается навеска почвы (примерно 20–30 г). Масса каждой навески почвы предварительно измеряется на весах. Далее сито с навеской почвы устанавливается в заполненную водой воронку. Важно проверить, чтобы вода полностью смочила почву, т. е. была на одном уровне с почвой. Каждая навеска снабжается этикеткой, на которой указываются дата и время закладки пробы на выделение, номер, место сбора, масса пробы. Нематоды, выходящие из почвы, будут постепенно оседать на дно пробирки.



Рис. 7. Воронка Бермана (по материалам сайта <https://www.plantpath.iastate.edu/tylkalab/content/extracting-nematodes-soil-baermann-funnel>)

Через 2 суток (около 48 часов) сито вынимается из воронки, пробирка отделяется от соединительной трубки, важно при этом зажать пальцами соединительную (резиновую) трубку, чтобы избежать дополнительного переливания воды из воронки в пробирку (или вместо этого использовать зажим Мора). Суспензия в пробирке (нематоды в воде) подвергается дальнейшей обработке в лаборатории. Сито и воронка освобождаются от содержимого и тщательно моются.

Данный метод может быть использован и для выделения нематод из растительных тканей. В этом случае в качестве навески выступают мелко нарезанные корни, стебли или листья.

Выделение нематод данным методом не нуждается в больших трудозатратах, при этом используется очень простое оборудование, однако метод обеспечивает высокий выход нематод из почвы. Лимитирующим фактором данного метода, в частности использования воронки Бермана, является ограничение размера образца и невысокое содержание кислорода, особенно в основании воронки, где и скапливаются нематоды (Smol et al.,

1999). Кроме того, следует заметить, что данный метод малоэффективен для выделения малоподвижных групп фитопаразитических нематод, например, криконеMATид. Более подробно ознакомиться с другими методами выделения подвижных форм нематод из почвы и растительной ткани, а также оценить эффективность методов в сравнительном аспекте можно, используя материал методического пособия «Methods and techniques for nematology» (van Bezooijen, 2006).

Выделение неподвижных форм нематод из почвы и растительных тканей

Подход к выбору методов выделения седентарных нематод определяется целями и задачами исследования. В случае, когда требуется выделить личинок в подвижной форме (при отборе образцов почвы в мае-июне – вылупившиеся личинки выходят из цист в почву и находятся в поиске корней растения-хозяина; во время миграции личинок вдоль проводящей системы растения до момента потери подвижности и перехода к седентарному образу жизни; либо самцов, вышедших из корней и находящихся в поисках самки), можно воспользоваться вороночным методом Бермана (см. описание выше). Неподвижные формы седентарных нематод представляют собой личинок, которые после того как достигли проводящей системы растения и сформировали область питания, теряют способность к движению и переходят к седентарному образу жизни с целью питания и размножения. Кроме того, в конце жизненного цикла нематод происходит формирование цист, представляющих собой также неподвижную форму.

Присутствие личинок внутри растительного организма и стадию жизненного цикла нематоды (подвижная или неподвижная форма) можно идентифицировать с помощью красителей, среди которых наиболее широко применяемым является раствор кислого фуксина. Метод основан на более интенсивном поглощении нематодами красителя по сравнению с растительной тканью. Промытые корни обесцвечивают раствором гипохлорита натрия (5,25 %) (в зависимости от возраста корней и степени их

лигнификации готовят смесь воды и гипохлорита натрия в соотношении 50:10/50:20/50:30) в течение 5 мин, после чего тщательно промывают водой. Далее корни помещают в кипящий раствор кислого фуксина (к 25 мл уксусной кислоты добавляют 75 мл воды и растворяют 0,35 г фуксина) на 30 с, промывают и добавляют подкисленный глицерин. Для визуализации корни рассматривают под микроскопом. Личинки нематод приобретают интенсивное красное окрашивание, в то время как ткани корней остаются слабо окрашенными.

После идентификации того, что нематода перешла на седентарный (неподвижный) образ жизни, личинок можно выделить из корней растений следующим способом: корни растений нарезают длиной около 1 см и измельчают с помощью блендера. Личинок отделяют от дебриса путем просеивания и центрифугирования в 35% растворе сахарозы при 1000 об./мин в течение 5 мин (Smant et al., 1997). Выделенных личинок собирают для проведения последующих анализов.

Выделение из почвы неподвижных форм – цист (завершающая стадия жизненного цикла цистообразующих нематод) – проводят методом Сейнхорста (Seinhorst, 1964), основанным на флотации цист в воде. Почвенный образец объемом 100 см³ помещается в сосуд (500 мл) слоем 3–4 см. До половины объема сосуда добавляется вода и хорошо перемешивается, пока почва полностью не увлажнится. Необходимо дать воде отстояться в течение нескольких минут (время зависит от типа почв), чтобы почвенные частички полностью осели на дно, цисты нематод при этом останутся на поверхности воды. Далее воду осторожно сливают в воронку с бумажным фильтром, установленную на штативе. На один почвенный образец закладывают по три воронки для фильтрования. Цисты скапливаются на бумажном фильтре, их собирают от периферии к центру фильтра и подсчитывают. Другой способ заключается в том, что после тщательного перемешивания воды в сосуде полученная взвесь пропускается через ряд сит (3–4) с различным диаметром ячеек (от 840 до 250 мкм). Крупные частицы почвы задержатся на первом сите, а на последнем останутся цисты с самыми мелкими частичками почвы. Сито необходимо промыть водой, чтобы очистить от мел-

ких глинистых частиц почвы, и высушить. Сухие цисты собираются специальным держателем, снабженным леской. Леска, смоченная в воде, легко подхватывает цисты, которые переносятся в каплю воды на часовом стекле или в маленькой чашке Петри (Матвеева, 2004). Для отделения цист от дебриса применяют метод центрифугирования: полученную после перемешивания взвесь помещают в центрифужную пробирку (100 мл) и центрифугируют 4 мин при 1800 g. Супернатант пропускают через сито (125 мкм) и собирают пустые плавающие цисты. Далее к осадку добавляют раствор $MgSO_4$ и тщательно перемешивают, после чего снова центрифугируют 3 мин при 1800 g. Супернатант пропускают через сито (диаметр пор 125 мкм), промывают водой и собирают цисты, которые помещаются в пробирку с водой. Далее содержимое пробирки выливается в воронку с фильтровальной бумагой, собираются цисты.

Растения, которые были изъяты с поля для анализа, как правило, содержат цисты разной степени зрелости: стадия белых самок, стадия от золотистого до темно-коричневого цвета. Для завершения созревания цист и последующего их выделения растения с прикорневой почвой помещают в сосуд и поливают водой примерно в течение 1 месяца. За это время цисты созревают и отделяются от корней, попадая в почву. Почву подсушивают до воздушно-сухого состояния и далее цисты выделяют вышеописанным методом Сейнхорста.

После выделения из почвы проводится подсчет количества цист и проверяется содержимое цист – количество яиц и личинок в расчете на 1 цисту, жизнеспособность яиц и личинок, степень зрелости яиц. Для этого цисты, выделенные из образца объемом 100 см^3 , помещаются на предметное стекло в каплю воды. Эту каплю закрывают концом другого предметного стекла и цисты раздавливают между ними для разрушения стенок цист и высвобождения яиц и личинок. Содержимое смывается со стекол в стакан, где уровень воды до 100 мл. При постоянном помешивании отбирают 1 мл пробы, которую помещают на специально разлинованную чашку Петри. Под биноклем подсчитывают среднее количество яиц и личинок в 1 мл взвеси, далее ведут пересчет на 100 мл , что соответствует 100 см^3 отобранной почвы.

К настоящему времени существует широкий спектр методик, позволяющих оценить жизнеспособность яиц и личинок, содержащихся в цистах. К наиболее распространенным способам относятся гистохимическое окрашивание и определение по морфологическим признакам. Быстро и эффективно оценить жизнеспособность яиц и личинок позволяют красители, например, New blue R (Shepherd, 1962), Nile Blue (Ogiga, Estey, 1974), Meldola's Blue (Twomey et al., 2000). Для этого цисту вскрывают в капле воды, добавляют несколько капель красителя и выдерживают в течение 4–5 мин, после чего просматривают под биноклем (увеличение 8×12,5). Мертвые яйца и личинки окрашиваются в интенсивно синий цвет. Живые яйца и личинки не окрашиваются или слегка окрашиваются гранулы в кишечнике личинок. Процедуру повторяют три раза.

В случае, когда в ходе исследования требуется установить не только сам факт жизнеспособности/нежизнеспособности, но также разобраться, за счет чего происходит снижение жизнеспособности (пустые яйца, недоразвитые яйца – остановившиеся на стадии бластомеризации, или яйца, содержащие мертвых личинок), используют оценку по морфологическим признакам. Для этого цисты вскрываются в капле воды, и содержимое просматривается под световым микроскопом. Основными диагностическими признаками жизнеспособности яиц являются степень поврежденности яйцевых оболочек, цвет содержимого яйца (светлое/темное), расположение личинки и степень ее свернутости внутри яйца; для личинок – поверхность кутикулы (гладкая или с повреждениями), степень развитости трофико-сенсорного отдела, содержимое кишечника. Наиболее подробное описание морфологических признаков можно найти в руководствах по визуальному определению жизнеспособности яиц и личинок *G. rostochiensis* у LaMondia et al. (1986) и Bulletin OEPP/EPPO (2017).

Среди современных способов определения жизнеспособности яиц и личинок можно выделить метод на основе определения содержания трехалозы – дисахарида, присутствующего в перевиталиновой жидкости яйца (Ebrahimi et al., 2015). Метод связан с экстракцией трехалозы из одной или нескольких цист и определении ее концентрации спектрофотометрическим способом. Для прове-

дения данного анализа можно воспользоваться готовым коммерческим набором, например, K-TREN 01/09 Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Ireland.

В последние годы внимание ученых все чаще связано с исследованиями возможности применения молекулярных методов в определении жизнеспособности яиц и личинок. В частности, разработан способ на основе ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующего красителя моноказид пропидия, который связывается с ДНК мертвых клеток, в результате чего происходит амплификация и детекция ДНК только жизнеспособных личинок (Christoforou et al., 2014).

Следует отметить, что выбор метода определения жизнеспособности яиц и личинок, содержащихся в цистах, зависит от поставленных целей и задач исследования, на решение которых они направлены.

Фиксация нематод

Основа метода: пробирка с суспензией нематод, фиксатор ТАФ (триэтаноламин-формалин-дистиллированная вода, в соотношении 2:7:91), термометр, водяная баня.

Из пробирок с нематодами аккуратно при помощи пипетки убираем верхний слой воды, так, чтобы в пипетку не попали нематоды, в результате в пробирке должно остаться около 1 мл. Далее в каждую пробирку вставляется предварительно подготовленная этикетка (кусочек кальки с указанием основной информации о пробе). Важно: надпись на этикетке должна быть сделана твердым карандашом во избежание ее стирания под действием фиксатора. Для умерщвления нематод необходимо нагреть пробирки при 60 °С в течение 2 минут, далее пробирки снимаются с водяной бани и заливаются фиксатором до метки (например, 3 мл).

Хорошие результаты получаются, если нематоды быстро умерщвлены и сразу зафиксированы. Если живых нематод помещают в холодный фиксатор, они обычно деформируются и их внешний вид портится. Умерщвление высокой температурой приводит к формированию характерной формы тела для определенных

таксонов нематод (изогнутая, спираль, прямая). При высокой температуре нематоды расправляются и становятся неподвижными, полупроницаемые свойства кутикулы изменяются так, что фиксатор хорошо проникает в тело нематод (Кириянова, Кралль, 1969).

При таком способе фиксации суспензия с нематодами сохраняется в течение долгого времени. Триэтаноламин нейтрализует муравьиную кислоту, является гидроскопичным, препятствует тому, чтобы фиксатор испарялся.

Изготовление временных препаратов

Нематоды после фиксации выбираются на предметные стекла в каплю глицерина, покрашенного синькой, и накрываются покровным стеклом. Данный метод позволяет получить временный глицериновый микропрепарат. Для его изготовления необходимо использовать бинокляр с диапазоном увеличений и с достаточным разрешением, хорошее освещение. Нематоды выбираются из суспензии препаровальными иглами, булавками. Для того чтобы минимизировать трудности при сборе нематод, необходимо использовать часовое стекло с небольшим количеством воды; нематоды должны располагаться в центре, лучше использовать самое низкое удобное увеличение микроскопа.

Изготовление постоянных препаратов

При изготовлении постоянных препаратов нематод необходимо провести нематод через спирто-глицериновые растворы:

Раствор 1: формалин (4 %) – 99 частей, глицерин – 1 часть

Раствор 2: этанол (96 %) – 95 частей, глицерин – 5 частей

Раствор 3: этанол (96 %) – 50 частей, глицерин – 50 частей

Умерщвленные нематоды помещаются в часовое стекло, содержащее раствор № 1. Затем часовое стекло располагают в эксикаторе, содержащем 96° спирт, на 12 часов при температуре 40 °С. По истечении этого времени в часовое стекло с нематодами добавляется раствор № 2. Часовое стекло накрывается предметным стеклом, при этом необходимо оставить небольшую

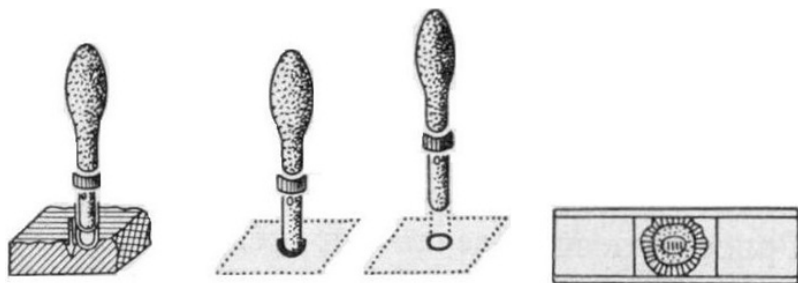


Рис. 8. Изготовление препаратов с помощью парафиновых колец (по: Иванова, 1976)

цель для медленного испарения спирта, и выдерживается в термостате при температуре 40 °С. Нематод для полного обезвоживания переносят в смесь спирта с глицерином (раствор № 3) и оставляют в течение нескольких дней при комнатной температуре. Постоянные препараты делаются с помощью парафиновых колец (рис. 8). Для этого берется медная трубка диаметром 1,5 см, вмонтированная в деревянную (резиновую) ручку, нагревается на спиртовке, отпечатывается на блоке парафина и быстро накладывается на чистое стекло, и на нем остается отпечаток парафина. После охлаждения на стекле образуется кольцо из парафина, внутрь которого помещается капля глицерина, а в нее помещаются нематоды и накрываются покровным стеклом. Препарат подогревается и после таяния парафина и выхода пузырьков воздуха охлаждается. Затвердевший парафин образует широкую и крепкую подставку такой же толщины, что и нематоды, и не допускает их расплющивания (Иванова, 1976). Микропрепарат подписывается и убирается на поднос для хранения стекол.

Изготовление препаратов анально-вульварной области (терминального участка) цист

Использование препаратов анально-вульварной области цист является одним из способов идентификации видов седентарных эндопаразитических нематод, в том числе цистообразующих (pp. *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera*). Для их изготовления берут-

ся зрелые и неповрежденные цисты, которые помещаются в воду на 24 часа. Затем одна циста переносится на органическое стекло в каплю воды. Под бинокляром глазным скальпелем разрезаем ее на две части, из задней части с помощью препаровальной иглы удаляем яйца с личинками. Терминальные участки сильно пигментированных цист можно просветлить в течение нескольких минут в перекиси водорода или лактофеноле. После этого терминальный участок аккуратно подрезаем с краев, оставляя только центральную часть, где находятся вульва и анус. Полученную анально-вульварную пластинку пинцетом переносим на предметное стекло в каплю глицерина. На стекле уже должен быть нанесен парафиновый круг. Для этого необходимо нагреть над спиртовкой один конец металлической трубки ($d = 1$ см), окунуть в парафин (точка плавления которого 60°C) и осторожно дотронуться до предметного стекла. Анально-вульварную пластинку помещают в каплю глицерина таким образом, чтобы своей внутренней поверхностью она была направлена на предметное стекло. Собирают 5–6 анально-вульварных пластинок, помещают по краю капли глицерина стеклянные волоски и покрывают покровным стеклом. Препарат помещают на специальную металлическую подставку, которая подогревается над огнем до расплавления парафинового круга, после чего немедленно переносят на холодную поверхность. Капля глицерина с анально-вульварными пластинками окружена парафином, который надежно скрепляет предметное и покровное стекла. В таком виде препарат готов к просмотру под средним увеличением микроскопа для изучения особенностей анально-вульварной области (см. «Идентификация цистообразующих нематод...» в параграфе 4.1).

Глава 4

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕМАТОД

4.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

Измерения фитопаразитических нематод и индексы, используемые при их диагностике

Нематод идентифицируют под микроскопом до рода (для половозрелых особей – до вида) с проведением морфологических измерений особей, основными из которых являются общая длина тела, его наибольшая ширина, длина пищевода, длина хвоста, длина ротовой полости, расстояние выделительной поры и вульвы от кончика головы, длина спикул и рулька (рис. 9). Кроме того, учитываются и соотношения вышеуказанных морфометрических показателей к общей длине тела нематоды – это так называемые индексы де Мана, которые первоначально было предложено обозначать греческими буквами (Кириянова, Кралль, 1969).

В настоящее время при определении и описании нематод общепринятыми являются следующие промеры и индексы:

L – длина тела (в мм или мкм),

a = общая длина тела / наибольшая ширина тела (в области вульвы),

b = общая длина тела / длина пищевода,

b' = общая длина тела / расстояние от начала тела до основания желез пищевода,

c = общая длина тела / длина хвоста,

c' = длина хвоста / диаметр тела в области ануса,

V = расстояние от головного конца тела до вульвы / общая длина тела (выражается в %).

В некоторых случаях дополнительно в микрометрах указывают длину хвоста (расстояние от ануса до кончика хвоста), длину стилета, длину спикул (по дуге).

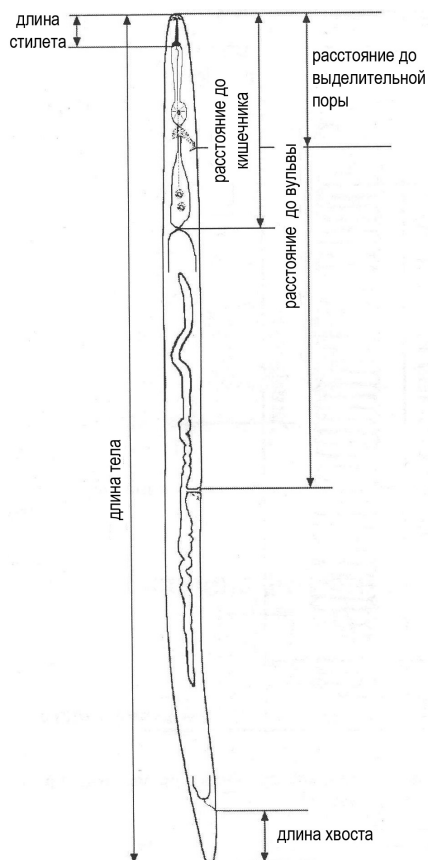


Рис. 9. Схема измерения тела самки нематоды (по: Таболин и др., 2017)

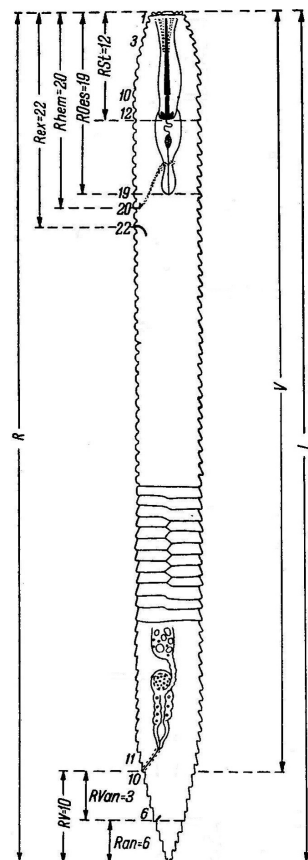


Рис. 10. Основные измерения, используемые при определении нематод сем. Criconematidae (по: Иванова, 1976)

Для определения видов нематод семейства Criconematidae используют специальные индексы, разработанные де Гриссом (Иванова, 1976) (рис. 10):

L – общая длина тела (в мм или мкм),
 R – общее количество колец на теле,
 RSt – количество колец на протяжении длины стилета (включая головки),
 ROes – количество колец от головы до основания пищевода,
 Rhem – количество колец от головы до гемизонида,
 Rex – количество колец от головы до выделительной поры,
 RV – количество колец от вульвы до терминауса хвоста,
 RVan – количество колец между вульвой и анусом,
 Ran – количество колец от ануса до терминауса хвоста,
 V – расстояние от головного конца тела до вульвы к общей длине тела, в %.

Идентификация цистообразующих нематод: изучение особенностей анально-вульварной области цист

На рис. 11 и 12 показаны общий вид, строение и необходимые измерения анально-вульварных областей цистообразующих нематод. На терминальном участке хорошо видна светлая часть кутикулы в виде пятна (вульварная область); в середине ее находится щель вульвы, вокруг которой расположены полуфенестры (полукольца)

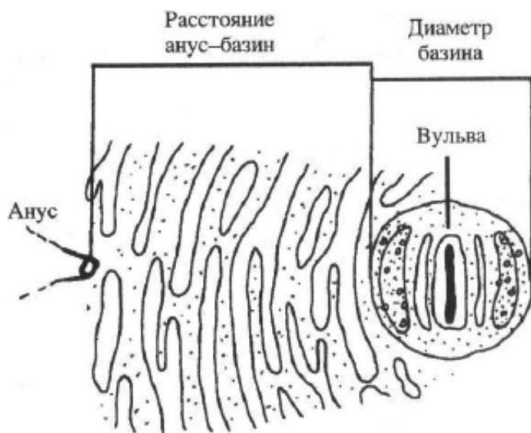


Рис. 11. Общий принцип строения анально-вульварной пластинки

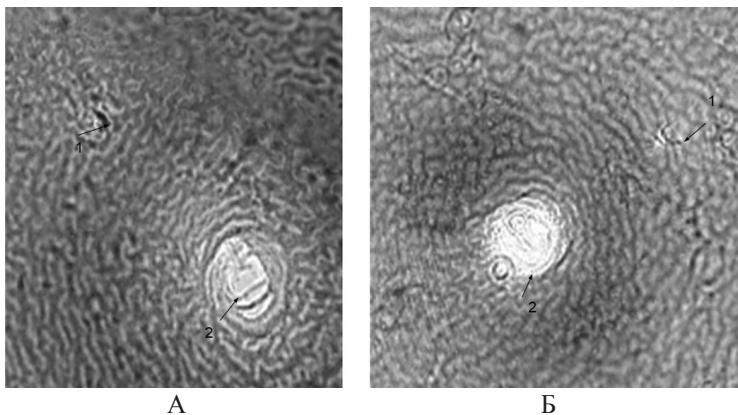


Рис. 12. Микрофотографии препаратов анально-вulварных областей цистообразующих нематод *G. pallida* (А) и *G. rostochiensis* (Б) (фото В. Н. Чиждова):

1 – область ануса; 2 – область вульвы

с папиллярными бугорками (туберкулами). На некотором расстоянии от вульварной области расположен анус. Между областью вульвы и анусом заметны складки кутикулы, количество которых является надежным видовым признаком для цистообразующих нематод. Расстояние между областью вульвы и анусом, разделенное на диаметр вульвы, позволяет вычислить индекс Гранека.

Для самок *G. rostochiensis* отмечен ряд характерных признаков (Кириянова, Кралль, 1971; Brzeski, 1998). Анус находится на значительном расстоянии от вульвы и у зрелых особей обозначен двумя расходящимися складками кутикулы. Щель вульвы очень маленькая (9–12 мк). Индекс Гранека составляет 2,0–7,0.

4.2. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ РОДОВ НЕМАТОД ПОД БИНОКУЛЯРОМ

Форма и размеры тела нематод, а также некоторые особенности внутреннего строения червя позволяют идентифицировать таксоны до уровня семейства, а в некоторых случаях даже до более низких

рангов, не используя микроскопы с высокой разрешающей способностью, а только при помощи бинокля. Форма тела нематод является одним из наиболее важных признаков для данных целей. Как правило, тело нематод имеет червеобразную форму, однако на определенном этапе развития часть высокоспециализированных таксонов паразитов приобретают шаровидную (р. *Globodera*) или лимоновидную форму тела (р. *Heterodera*) (рис. 13, А). Особи других видов при фиксации образуют «спираль» (р. *Helicotylenchus*, рис. 13, Б) или

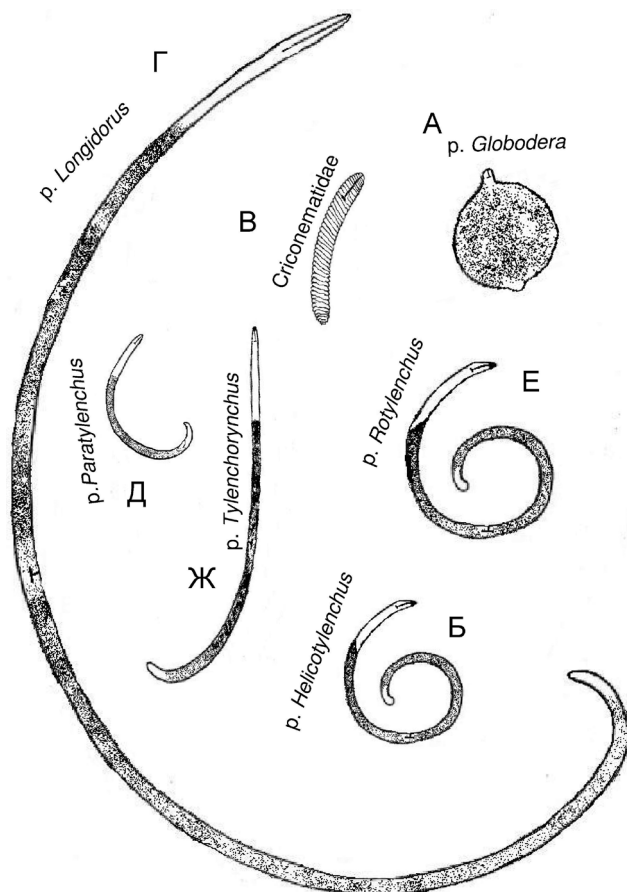


Рис. 13. Форма и размеры тела некоторых таксонов фитопаразитических нематод

характеризуются грубой кольчатостью кутикулы, так называемые «кольчатые нематоды» (сем. *Criconematidae*, рис. 13, В). Другим немаловажным признаком является размер тела нематоды, его значения варьируют в широких пределах от 0,1 до 13 мм. Например, нематоды вида *Longidorus elongatus* имеют тонкое, нитевидное тело, которое достигает 4–6 мм в длину (рис. 13, Г), а нематоды р. *Paratylenchus* (рис. 13, Д), напротив, характеризуются очень небольшими размерами, которые в среднем составляют 0,3 мм.

К другим характерным чертам, позволяющим различать некоторые таксоны между собой на предварительной стадии просмотра нематодофауны под биноклем, относятся особенности строения пищеварительной системы. Так, железы пищевода у двух близкородственных родов нематод *Rotylenchus* и *Helicotylenchus* покрывают начало кишечника с брюшной, боковых и спинной сторон, однако наибольшая длина желез у р. *Rotylenchus* отмечается со спинной стороны (рис. 13, Е), а у *Helicotylenchus* (рис. 13, Б), напротив, с брюшной стороны. У других таксонов железа покрывает кишечник равномерно (рис. 13, Ж). Под биноклем данная особенность строения червя распознается как разделение тела на светлую (пищевод) и темную (кишечник) область с тем или иным наклоном.

4.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

В настоящее время эффективными способами идентификации фитопаразитических нематод являются молекулярные методы, основанные на анализе ДНК. За последние десятилетия накоплено достаточно много информации о полиморфных участках ДНК, по которым можно определить конкретный вид в смешанном образце или разделить близкородственные виды.

Наиболее широко применяемые молекулярные методы основываются на полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей амплифицировать (увеличить) малые концентрации определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом мате-

риале (пробе). Основными преимуществами являются высокий уровень чувствительности, точность, специфичность и воспроизводимость. Однако, несмотря на явные преимущества ПЦР анализа, выбор оптимальной стратегии анализа необходим для каждого элемента диагностики в каждом конкретном случае: отбор проб (индивидуальная особь или смешанный образец, почвенный образец или растительный материал), выбор маркерных регионов ДНК (подбор праймеров) и метода их исследования (вид ПЦР анализа). При этом всегда следует помнить о необходимости процесса валидации, оптимизации протоколов проведения метода, учитывать количество выделенной ДНК, возможность контаминации образцов, ведущей к получению ложноположительных и отрицательных результатов.

Основные этапы молекулярной идентификации фитопаразитических нематод включают:

1. Выделение ДНК;
2. Проведение ПЦР;
3. Электрофорез или электрофорез с последующим секвенированием продукта амплификации.

Количество этапов определяется целями и задачами исследований.

Выделение ДНК

Выделение ДНК может проводиться как из одной особи, так и из нескольких. Процедура основана на применении химической обработки (лизисного буфера, содержащего трис-НСI, ЭДТА и протеиназу К) и механической гомогенизации. Выделение ДНК также можно проводить, используя готовые коммерческие наборы, содержащие все необходимые компоненты, и следуя указаниям к набору фирмы-производителя. Выбор способа выделения ДНК определяется целями и задачами исследований.

Проведение ПЦР анализа

Основное назначение ПЦР заключается в амплификации нуклеиновой кислоты, т. е. увеличении концентрации интересующего с точки зрения идентификации участка ДНК нематоды, пригодного для последующего анализа. Проведение ПЦР анализа включает использование подготовленного раствора выделенной ДНК и реакционной смеси, включающей Taq ДНК-полимеразу, нуклеотиды (dNTP), буферный раствор, воду, свободную от нуклеаз, и специфические или

неспецифические праймеры. Программу амплификации подбирают в зависимости от размера и нуклеотидного состава праймеров и амплифицируемого фрагмента.

Результаты анализа считаются надежными в том случае, когда каждая серия выделения нуклеиновых кислот и их амплификации сопровождается постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. В связи с этим при выполнении молекулярных анализов тем минимумом, который следует использовать, являются:

1. Положительный контроль нуклеиновой кислоты. Используется для отслеживания эффективности амплификации (наряду с выделением);

2. Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы). Данный контроль необходим для традиционной ПЦР, чтобы исключить ложные положительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Используемая при подготовке реакционной смеси вода для ПЦР добавляется на этапе амплификации;

3. Отрицательный контроль выделения. Данный контроль ставится для отслеживания загрязнения в процессе выделения нуклеиновой кислоты. Контроль включает выделение нуклеиновой кислоты и последующую амплификацию только экстракционного буфера. ПЦР будет считаться действительной только при соблюдении следующих двух критериев:

- положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит ампликон правильного размера, соответствующего изучаемому виду нематоды;

- в отрицательном контроле качества выделения и отрицательном контроле амплификации не производится ампликонов правильного размера, соответствующего изучаемому виду нематоды.

Современная идентификация фитопаразитических нематод основывается на рибосомной, митохондриальной и сателлитной ДНК, что определяет, в свою очередь, тип праймеров.

Рибосомная ДНК – tandemный кластер генов, кодирующих 18S, 5,8S и 28S рибосомную РНК. Эти гены разделены внутренни-

ми транскрибируемыми спейсерами (ITS1 и ITS2). Два соседних кластера разделяются внешними (нетранскрибируемыми) спейсерами различной длины.

Митохондриальная ДНК – относительно небольшие круговые молекулы в диапазоне от 12 до 20 килобаз. Подходят для идентификации нематод вследствие возможных расхождений в последовательностях мтДНК из-за вставок, делеций и ускоренного отношения мутаций по сравнению с ядерной ДНК.

Сателлитная ДНК – сильно повторяющиеся tandemные массивы коротких последовательностей от 70 до 2000 пар оснований. Он имеет разные сигнатурные последовательности, число копий, длину и полиморфные области, которые можно использовать как видоспецифические маркеры.

Существуют различные виды ПЦР анализа, различающиеся по используемым праймерам. К наиболее распространенным относятся ПЦР в формате FLASH с применением SCAR-маркеров, RAPD ПЦР с использованием случайных праймеров, ПЦР со специфическими праймерами, SPLAT-ПЦР с локус-специфичными праймерами, ПЦР в режиме реального времени.

Электрофорез и секвенирование

Полученные в ходе ПЦР продукты амплификации разделяют в агарозном или полиакриламидном геле (ПААГ). При этом в лунку рядом с образцами вносят стандартные маркеры длин фрагментов ДНК для определения размера амплифицируемого фрагмента. Для визуализации ПЦР-продуктов проводят окрашивание геля бромистым этидием либо в образцы перед электрофорезом добавляют краситель и регистрируют в проходящем УФ свете. Продукт амплификации может быть подвергнут дальнейшему исследованию, например, секвенированию, что дает возможность определить с высокой точностью таксономическую принадлежность исследуемой нематоды.

Для многих экономически значимых фитопаразитических нематод, таких как *Globodera*, *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Bursaphelenchus* и др., существуют готовые разработанные протоколы молекулярной идентификации, с которыми можно ознакомиться на сайте <https://www.eppo.int>.

Кроме того, использование молекулярно-генетических методов является эффективным инструментом при необходимости точного определения вида фитопаразитической нематоды, например, если она была обнаружена впервые или является редкой для региона, также данные методы позволяют разделить близкородственные виды и закрепить навыки зрительного «узнавания» объекта, что в случае идентификации с использованием морфометрических показателей не всегда возможно. В данном учебно-методическом пособии мы приводим протокол молекулярной идентификации для отдельных особей фитопаразитических нематод на примере вида *Nagelus leptus* Siddiqi 1979, являющегося редким на территории Республики Карелия. Выделение нематод из почвы при проведении молекулярно-генетического анализа для отдельных особей осуществляется общепринятыми в нематологии методами (van Bezooijen, 2006). Однако фиксация нематод с использованием формалина, который часто применяется при морфологической идентификации особей, вследствие его разрушающего действия на нуклеиновые кислоты невозможна. В данном случае необходимо использовать спирт либо не проводить фиксацию, а использовать живых или высушенных особей. Отдельные особи нематод помещаются по одной (при необходимости несколько экземпляров), в пластиковые пробирки (0,5 мл), содержащие 25 мкл воды. При этом с помощью иглы тело нематоды необходимо рассечь на две (или больше) части или надорвать для облегчения выделения ДНК. Дальнейшее выделение по методике, предложенной Холтерманом с соавторами (Holterman et al., 2006), подразумевает обработку лизирующим буфером (в его состав входит протеиназа К и меркаптоэтанол) объемом 25 мкл при 65 °С в течение 90 минут, с последующим нагревом до 95 °С на 5 минут. Первичный анализ последовательностей, депонированных в ГенБанке NCBI, показал, что для нематод рода *Nagelus* в базе данных имеются в основном последовательности D2-D3-сегмента большой субъединицы рибосомы (LSU rDNA). Поэтому для работы нами были выбраны праймеры D2A (5'-ACA-AGT-ACC-GTG-AGG-GAA-AGT-TG-3') и D3B (5'-TCG-GAA-GGA-ACC-AGC-TAC-TA-3') (Nunn, 1992). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали от 0,8 до 1,6 мкл

полученного гомогената (раствор с ДНК), к которому добавляли прямой и обратный праймеры (см. выше), нуклеотиды (dNTP), буферный раствор, воду, свободную от нуклеаз, ДНК-полимеразу (набор Encyclo Plus PCR kit, компания «Евроген»). Процедура ПЦР включала: первичную денатурацию в течение 3 минут; отжиг праймера в течение 45 с при 50 °С; элонгацию в течение 4 мин при 72 °С; 40 циклов с одинаковыми параметрами (94 °С, 60 с; 50 °С, 60 с и 72 °С, 60 с); финальную элонгацию в течение 4 мин при 72 °С. Необходимо помнить об обязательной постановке положительного и отрицательного контролей. Полученные ПЦР продукты очищали в агарозном геле (агароза+буфер TAE, 1:50), для этого к продуктам ПЦР добавляли маркер молекулярной массы и вносили в лунки геля. Электрофоретическое разделение проводили в вертикальной электрофоретической камере. После этого гель визуализировали в ультрафиолетовом свете, фотодокументировали. Полоски с ДНК вырезали, из полученных блоков извлекали ДНК с помощью колонок фирмы «Promega» (Wizard ® SV Gel and PCR Clean-Up System). Извлечение и очистка ДНК включала использование нескольких промывающих растворов, перемежающееся с несколькими циклами центрифугирования. Полученный раствор ДНК еще раз очищали преципитацией этанолом в присутствии ацетата аммония, после чего следовал этап секвенирования. Полученные после секвенирования хроматограммы анализируют при помощи программ «Gendoc version 2. 5. 000» (Nicholas, Nicholas, 1997), «Clustal X version 1.81» (Thompson et al., 2002), MEGA5. Поиск родственных последовательностей проводится в ГенБанке с помощью алгоритма BLAST.

Глава 5

ХРАНЕНИЕ, ОБРАБОТКА И ПЕРВИЧНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

5.1. БАЗЫ ДАННЫХ. ЭЛЕКТРОННЫЙ АТЛАС ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ

Одним из способов систематизации и хранения больших массивов полученных сведений являются базы данных. Например, информация о разнообразии, распространении и численности фитопаразитических нематод естественных и трансформированных биоценозов Республики Карелия обобщена в виде электронного атласа, включающего фотографии обнаруженных таксонов нематод в формате «JPG» и информацию об их систематическом положении (Свидетельство о государственной регистрации № 2018620198 от 02.02.2018) (рис. 14). Материал, оформленный в таком формате, может быть использован в научных, консультационных и учебных целях как наглядный материал в биологических и аграрных вузах.

В процессе проведения исследований накапливается значительный массив данных, среди которых можно найти определенные закономерности, требующие объективной оценки и научного объяснения. В этом случае необходимо применять методы статистической обработки, что позволит объективно оценить результаты, понять, достоверны ли полученные различия. В настоящее время существует широкий спектр статистических методов, выбор которых определяется целями и задачами исследования. Основы и алгоритмы вычислений приводятся в специальных пособиях по вариационной статистике; некоторые из них указаны в списке рекомендуемой литературы.

Таксоны				
Наименование	ср	Семейство	Род	Вид
Cephalenchus	3	Tylodoridae Paramonov, 1967	Cephalenchus Goodey, 1962	
Criconema	3	Criconematidae Taylor, 1936	Criconema Hoffmann & Menzel, 1914	
Criconema sphagni	3	Criconematidae Taylor, 1936	Criconema Hoffmann & Menzel, 1914	Criconema sphagni Mic
Ditylenchus destructor	3	Anguinidae Nicoll, 1935 (1926)	Ditylenchus Filipjev, 1936	Ditylenchus destructor
Ditylenchus dipsaci	3	Anguinidae Nicoll, 1935 (1926)	Ditylenchus Filipjev, 1936	Ditylenchus dipsaci (Ю
Echpyadophora	3	Echpyadophoridae Skarbilovich, 1959	Echpyadophora de Man, 1921	
Geocnemas	3	Telotylenchidae Siddiqi, 1960	Geocnemas Thorne & Malek, 1968	
Globodera rostochiensis	3	Heteroderidae Filipjev & Schuurmans St	Globodera Skarbilovich, 1959	Globodera rostochiensis
Gracilancea	3	Tylodoridae Paramonov, 1967	Gracilancea Siddiqi, 1976	
Helicotylenchus	3	Hoplolaimidae Filipjev, 1934	Helicotylenchus Steiner, 1945	
Hemicycliphora	3	Hemicycliphoridae Skarbilovich, 1959	Hemicycliphora de Man, 1921	
Heterodera	3	Heteroderidae Filipjev & Schuurmans St	Heterodera Schmidt, 1871	
Hirschmanniella	3	Pratylenchidae Thorne, 1949	Hirschmanniella Luc & Goodey, 1964	
Longidorella	5	Nordidae Jairajpuri & Siddiqi, 1964	Longidorella Thorne, 1939	
Longidorus	5	Longidoridae Thorne, 1935	Longidorus Micoletzky, 1922	
Meloidogyne	3	Meloidogyridae Skarbilovich, 1959	Meloidogyne Goeldi, 1892	
Mesocriconema=Macropo	3	Criconematidae Taylor, 1936	Mesocriconema Andrassy, 1965	
Nagelus	3	Telotylenchidae Siddiqi, 1960	Nagelus Thorne & Malek, 1968	
Paratrichodorus	4	Trichodoridae Thorne, 1935	Paratrichodorus Siddiqi, 1974	
Paratylenchus	3	Paratylenchidae Thorne, 1949	Paratylenchus Micoletzky, 1922	
Paratylenchus microdorus	3	Paratylenchidae Thorne, 1949	Paratylenchus Micoletzky, 1922	Paratylenchus microdo
Paratylenchus nanus	2	Paratylenchidae Thorne, 1949	Paratylenchus Micoletzky, 1922	Paratylenchus nanus C
Paratylenchus straeleni	3	Paratylenchidae Thorne, 1949	Paratylenchus Micoletzky, 1922	Paratylenchus straeler
Pratylenchoides	3	Pratylenchidae Thorne, 1949	Pratylenchoides Winslow, 1958	
Pratylenchus	3	Pratylenchidae Thorne, 1949	Pratylenchus Filipjev, 1936	
Punctodera	3	Heteroderidae Filipjev & Schuurmans St	Punctodera Mulvey & Stone, 1976	
Rotylenchus	3	Hoplolaimidae Filipjev, 1934	Rotylenchus Filipjev, 1936	
Sphaeronema	3	Sphaeronematidae Raski & Sher, 1952	Sphaeronema Raski & Sher, 1952	
Trichodorus	4	Trichodoridae Thorne, 1935	Trichodorus Cobb, 1913	
Tylenchorhynchus	3	Telotylenchidae Siddiqi, 1960	Tylenchorhynchus Cobb, 1913	
Xiphinema	5	Longidoridae Thorne, 1935	Xiphinema Cobb, 1913	
сем. Criconematidae	3	Criconematidae Taylor, 1936		
сем. Trichodoridae	4	Trichodoridae Thorne, 1935		

Пробы с Nagelus					
№ пробы	Дата пробы	№ места отбора	Место отбора	Кол-во	Кол-во изображен
156	10.08.2009	143	о. Б. Климецкий, дер. Петры, нижняя часть скло	45	0
373	26.07.2013	353	о. Валаан, интродуценты - пихта балзахамическа	157	0
359	12.08.2013	339	о. Б. Соловецкий, интродуценты - липа сердцевид	3	0
423	16.07.2013	384	Ботанический сад ПетрГУ, интродуценты - соосн	10	0
436	04.09.2013	396	Петрозаводск, набережная Онежского оз., ясени	4	0
460	01.08.2014	337	о. Б. Соловецкий, интродуценты - пихта балзах	13	0
830	13.08.2014	408	г. Кировск, ПАБСИ, дуб черешчатый	3	0
829	13.08.2014	409	г. Кировск, ПАБСИ, вяз шершавый	12	0
828	13.08.2014	410	г. Кировск, ПАБСИ, ясень маньчжурский	53	0
827	13.08.2014	411	г. Кировск, ПАБСИ, пихта сибирская	18	0
825	13.08.2014	413	г. Кировск, ПАБСИ, клен татарский	11	0
294	29.06.2015	234	Воронovo, контроль, участок 5	1	0
824	27.06.2016	404	г. Кировск, ПАБСИ, липа сердцевидная	3	0
453	15.07.2015	398	Петрозаводск, Сайнаволок, липа мелколистная	12	0
989	29.06.2015	235	Воронovo, контроль, участок 1	97	0
242	22.06.2012	222	Петрозаводск, Губернаторский парк, липа	19	4
909	27.06.2016	403	г. Кировск, ПАБСИ, клен остролистный	7	4
293	29.06.2015	233	Воронovo, контроль, участок 2	127	5

Изображения

Закрыть

Рис. 14. Структура электронного атласа

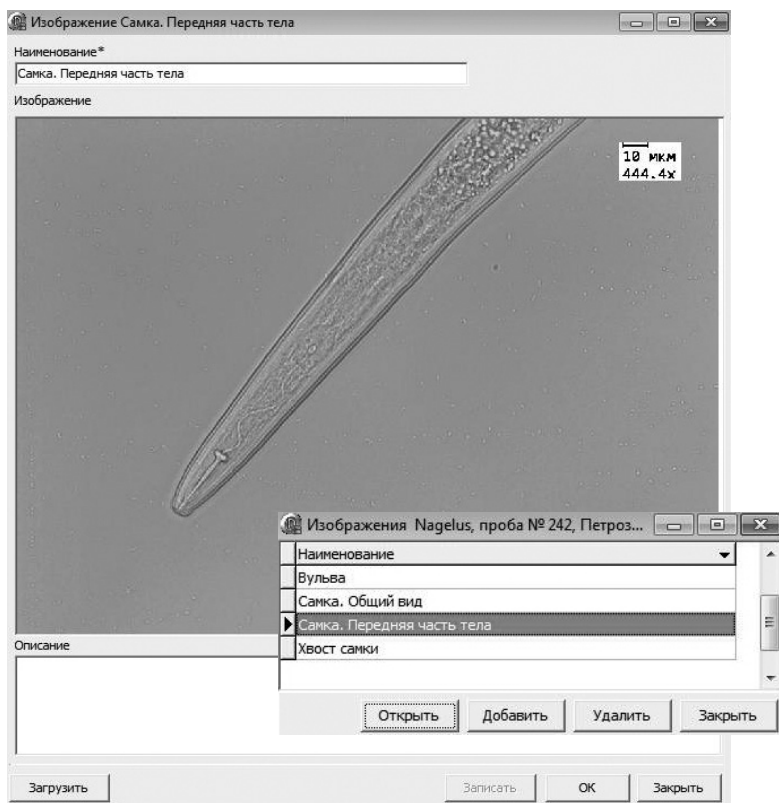


Рис. 14. Окончание

5.2. ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИЕ НЕМАТОДЫ КАК ЧАСТЬ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД

Группа нематод-фитопаразитов может быть изучена в рамках комплексных исследований сообществ почвенных нематод. При этом нематоды, трофически, т. е. в своем питании, связанные с растением, могут быть разделены на две группы. Первая группа включает нематод, ассоциированных с растениями (в англоязычных публикациях – plant-associated nematodes или root-fungal feeders), способных питаться как за счет эпидермальных клеток корней, так и содержимым гифов грибов. Вторая группа

представлена паразитами растений (plant-parasitic nematodes), имеющими мощный стилет, развитые эктоферментативные железы с лизирующим действием и в целом более тесный контакт с растениями. Однако в современных работах широко распространен подход, согласно которому нематоды, ассоциированные с растениями, и паразиты растений не рассматриваются отдельно и объединяются под термином «фитотрофы» или «растительноядные» (plant feeders).

Для оценки комплексов фитопаразитических нематод в почве используют следующие параметры:

1. Численность нематод (плотность популяций), экз./100 г (или 100 см³) почвы;
2. Таксономическое разнообразие нематод (количество родов /видов);
3. Встречаемость таксона – число проб с присутствием таксона по отношению к общему числу отобранных проб (в %);
4. Относительное обилие нематод-паразитов растений в сообществе почвенных нематод (в %).

Известно, что данные параметры значительно варьируют в зависимости от типа исследованного биоценоза. Так, в хвойных лесах фитопаразиты характеризуются самой низкой встречаемостью в пробах по сравнению с биоценозами других типов. Однако по данным для Республики Карелия в ельниках представители семейства Criconematidae, известные как паразиты корней многолетних древесных культур, были найдены в 46,7 % проб (наибольший показатель среди всех исследованных биоценозов). Низкая встречаемость и плотность популяций паразитов растений в хвойных лесах Карелии связана с доминированием мхов, лишайников, карликовых кустарничков в травяно-кустарничковом ярусе зрелых лесов и низким проективным покрытием высших растений – основного источника питания фитопаразитов.

Луговые биоценозы Карелии, напротив, характеризуются высоким разнообразием нематод-паразитов растений, что связано с большим флористическим богатством травянистых сообществ, которое способствует расширению списка выявленных таксонов.

Максимальная встречаемость отмечена для нематод родов *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus* и *Tylenchorhynchus* – типичных паразитов луговых трав.

В агроценозах, характеризующихся узким видовым составом растений-хозяев, численность определенных видов нематод, как правило, увеличивается. Так, в комплексе фитопаразитов почвы картофельных полей региона количественно преобладают и имеют высокую встречаемость нематоды вида *Globodera rostochiensis*. Этот облигатный седентарный эндопаразит корневой системы картофеля является возбудителем глободероза картофеля – широко распространенного и наиболее вредоносного заболевания этой культуры на территории России.

Антропогенная трансформация содействует расширению ареалов видов почвенных нематод в результате интродукции растений (случайный занос с посадочным материалом), с одной стороны, и создает условия для доминирования устойчивых видов (в частности, фитопаразитов) в ходе загрязнения среды – с другой. Так, на примере промышленных зон установлено количественное преобладание нематод-фитотрофов в сообществах при загрязнении почвы тяжелыми металлами.

При интродукции древесных культур показано увеличение разнообразия нематод-паразитов растений по сравнению с естественными лесными биоценозами, сформированными аборигенными видами. В прикорневой почве интродуцентов найдены редкие для Севера и Северо-Запада России виды нематод – *Cephalenchus leptus*, *Nagelus leptus*, *Paratrichodorus pachydermus*, *Longidorus elongatus*, что служит в пользу гипотезы о проникновении новых и распространении редких видов паразитических нематод при интродукции растений в экосистемы Европейского Севера России.

На рис. 15 представлены фотографии типичных для Республики Карелия естественных и трансформированных биоценозов с перечислением таксонов фитопаразитических нематод и указанием их численности. Например, комплекс фитопаразитов в агроценозах с посадками картофеля на здоровой (не инфицированной *G. rostochiensis*) почве представлен родами *Tylenchorhynchus*,

Paratylenchus, *Pratylenchus*, тогда как при среднем и высоком уровнях заражения почвы в группе паразитов растений преобладает вид *G. rostochiensis*, замещая представителей других видов паразитических нематод (фото С, D).

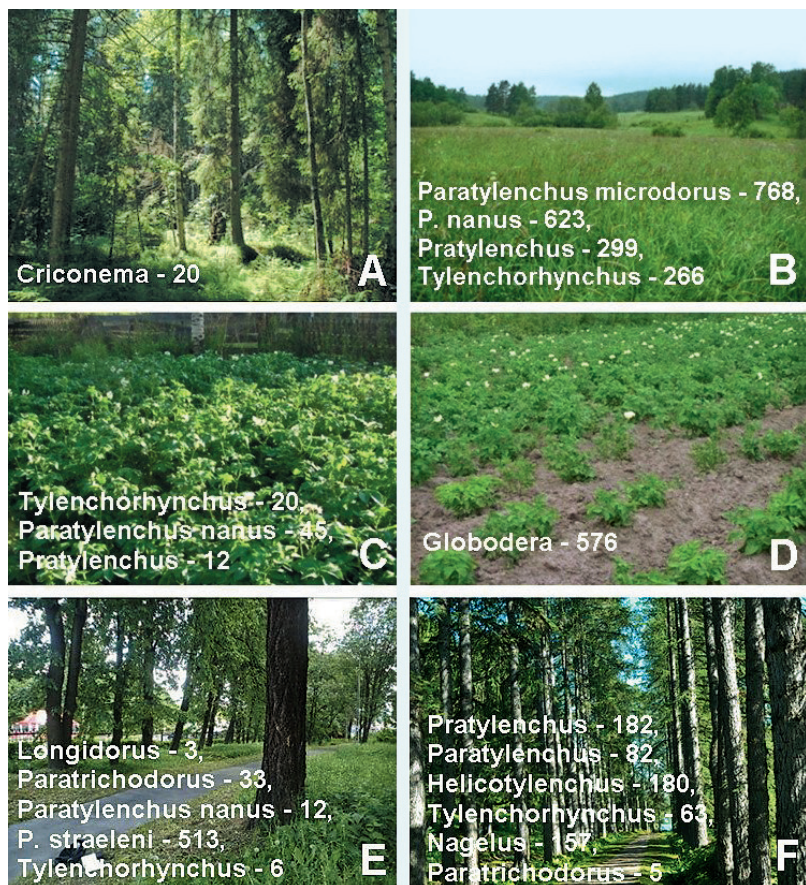


Рис. 15. Распространение и численность (экз./100 г почвы) фито-паразитических нематод в естественных и трансформированных биоценозах Карелии:

А – ельник; В – луг; С – картофельное поле (здоровое); D – картофельное поле (зараженное *Globodera rostochiensis*); Е – урбаноценоз; F – биотоп с древесными интродуцентами

Индекс зрелости и его модификации

Комплекс фитопаразитических нематод в экологических исследованиях может быть оценен с использованием специального PPI-индекса (Plant Parasite Index), являющегося модификацией индекса зрелости сообществ нематод (Maturity index, MI).

Индекс зрелости сообществ нематод MI, предложенный голландским ученым-нематологом Томом Бонгерсом для оценки состояния почвенной экосистемы, определяется на основе состава и численности таксонов нематод с различными экологическими особенностями, которые связаны с их морфологией, биологией и экологией и выражены в значениях, присвоенных каждому таксону по *c-p*-шкале Бонгера (Bongers, 1990): от колонизаторов ($c-p = 1$), устойчивых к неблагоприятным условиям существования с быстрыми темпами размножения (r-стратегии), до персистеров ($c-p = 5$), чувствительных к факторам окружающей среды, имеющих низкую репродуктивную способность и длинные жизненные циклы.

Индекс MI рассчитывается с учетом только свободноживущих нематод (имеющих значения от 1 до 5 по *c-p* шкале) и характеризует нарушение среды в целом. Низкие значения являются показателями высокой нарушенности среды или привноса органики в почву; высокие – указывают на стабильные условия обитания (Bongers, 1990). Индекс MI можно рассматривать как индикатор сукцессионных изменений почвенной экосистемы после нарушений: низкие его значения указывают на начальную стадию сукцессии, высокие – более позднюю стадию сукцессионных изменений.

Индекс PPI сравним с MI, но вычисляется с учетом только паразитических нематод (со значениями от 2 до 5 по *c-p* шкале), численность которых определяется состоянием растений-хозяев, которое, в свою очередь, зависит от уровня обогащения почвенной экосистемы питательными элементами и плодородием. Так, в условиях бедных почв, более характерных для естественных биоценозов, отмечается высокая доля нематод сем. Tylenchidae ($c-p = 2$)

в сообществе, что приводит к заметно более низким PPI значениям по сравнению с искусственно обогащенными почвами агроэкосистем (Nematodes..., 2009).

Кроме того, для оценки уровня обогащения почвы в агроэкосистемах был предложен расчет соотношения PPI/MI. Снижение индекса MI и увеличение PPI отмечено с возрастанием доступности питательных ресурсов в почве (Bongers, Korthals, 1995). Таким образом, соотношение PPI/MI будет ниже в условиях бедных почв с недостатком питательных веществ, чем в плодородных почвах.

Индекс зрелости сообществ нематод ΣMI , учитывающий при расчете все группы нематод (как свободноживущих, так и паразитических, т. е. учитывает оба описанных выше индекса), был предложен в 1994 году Йейтсом и базируется на предположении о том, что сообщество почвенных нематод в целом обеспечивает более полную, интегральную информацию о состоянии среды и уровне ее нарушенности.

Примеры расчета данных индексов и некоторых других модификаций индекса зрелости приведены в табл.

Расчет индексов MI, MI2-5, ΣMI , $\Sigma MI2-5$, PPI и PPI/MI для двух сообществ нематод (образцы А и В) с одинаковым числом таксонов и общей численностью нематод (Nematodes..., 2009)

Nematode taxon	Sample A	Sample B	c-p	Feeding	A		A		A		B		A		B		A		B	
					MI	MI	MI2-5	MI2-5	ΣMI	ΣMI	$\Sigma MI2-5$	$\Sigma MI2-5$	PPI	PPI	PPI	PPI	PPI	PPI	PPI	PPI
					c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn	c-p wtd propn
Hoplolaimidae	5	15	3	H					0.1	0.4	0.1	0.8	1.5	1.5						
Pratylenchidae	5	15	3	H					0.1	0.4	0.1	0.8	1.5	1.5						
Aphelenchidae	15	5	2	F	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2								
Cephalobidae	15	2	2	B	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.0	0.3	0.1								
Plectidae	2	15	2	B	0.0	0.4	0.0	1.0	0.0	0.3	0.0	0.5								
Rhabditidae	2	50	1	B	0.0	0.6			0.0	0.5										
Dorylaimidae	50	5	4	O	2.0	0.3	2.1	0.7	1.8	0.2	1.9	0.3								
Discolaimidae	15	2	5	P	0.8	0.1	0.8	0.3	0.7	0.1	0.7	0.2								
Relevant total	109	109			99	79	97	29	109	109	107	59	10	30						
MI	3.4	1.6																		
MI2-5	3.5	2.6																		
ΣMI	3.4	2.0																		
$\Sigma MI2-5$	3.4	2.8																		
PPI	3.0	3.0																		
PPI/MI	0.9	1.9																		

H=plant feeders, F=fungal feeders, B=bacterial feeders, O=omnivores, P=predators. In the columns in which each index is calculated, the total number of nematodes meeting the criteria of the index is first determined (relevant total) and then the proportion of that total in taxa meeting the criteria is weighted by the c-p values of those taxa. The index value is the sum of the weighted proportions.

5.3. ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАРАЖЕНИЯ ПОЧВЫ И РАСТЕНИЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩИМИ НЕМАТОДАМИ

Цистообразующие нематоды являются эндопаразитами корневой системы многих сельскохозяйственных культур, нанося существенный экономический ущерб за счет снижения качественных и количественных характеристик урожая. При проведении исследований особое значение имеют данные по уровню зараженности почвы и растений цистообразующими нематодами, на основе которых можно судить о распространении паразита, состоянии популяции, эффективности применяемых мер борьбы с ним.

Данные могут быть представлены следующим образом:

- в виде абсолютных значений, которые выражаются как количество цист (яиц и личинок) на растение или количество цист (яиц и личинок) на 100 см³ почвы;
- рассчитывают коэффициент размножения (k_r), который отражает репродуктивный потенциал нематоды. Если в исследовании уровень заражения растений и почвы оценивается по количеству цист, то применяется следующая формула: $k_r = P_f / P_i$, где P_f – количество цист нематоды в конце опыта, P_i – доза заражения или исходное число цист. Когда расчет ведется на количество яиц и личинок, содержащихся в цистах, то применяют формулу $k_r = (P_f \times N_f) / (N_i)$, где P_f – количество цист в конце опыта; N_f – количество яиц и личинок в 1 цисте новой генерации в конце эксперимента; N_i – количество яиц и личинок в 1 цисте исходной популяции нематоды в начале опыта.

В зависимости от целей исследования в расчетах важно учитывать «качество» цист, т. е. жизнеспособность яиц и личинок, находящихся в них. Это необходимо для учета инвазионного потенциала популяций цистообразующих нематод и его изменения при неблагоприятных факторах среды. Например, личинки нематоды инвазируют и проходят основные стадии развития в корнях растения-хозяина. Однако при неблагоприятных условиях развития (недостаток питательных веществ, высокая температура, активные защитные реакции растения и др.) проникшие в корни личинки не могут полностью завершить жизненный цикл, что влечет за собой подавление

репродуктивных возможностей самок нематоды: созревание самок продолжается, цисты формируются, но с некачественным содержанием, что не позволяет сохранять инвазионный потенциал популяции для последующего успешного заражения растений.

Подсчет жизнеспособности яиц и личинок проводят по формуле:

Жизнеспособность (%) = $n / N \times 100 \%$, где n – живые яйца и личинки, N – общее количество яиц и личинок.

Применение в исследованиях методов окраски растительных тканей для определения стадий паразитирующих личинок нематод позволяет судить о количестве личинок, которые смогли проникнуть в корни, при условии знания исходного уровня заражения. Это, в свою очередь, используется в анализе эффективности методов ограничения численности паразита.

Анализ полученных данных возможен по нескольким направлениям в зависимости от целей исследования и представлен на примере картофельной цистообразующей нематоды *G. rostochiensis*.

Оценка пространственного распределения нематоды

Картофельная нематода расселяется довольно быстро. Цисты нематоды на большие расстояния разносятся ветром или потоками воды; переносятся на обуви и поверхности орудий труда. Перевозки семенного и пищевого картофеля также благоприятствуют ее расселению. Все это способствует возникновению новых очагов глободероза – заболевания растений, вызванного паразитированием личинок нематоды рода *Globodera*. Систематические обследования посадок картофеля на предмет зараженности растений проводят для своевременного выявления, последующей локализации и ликвидации очагов. Изучение содержания цист на корнях растений и в прикорневой почве позволяет определить пространственное размещение цистообразующих нематод на площади картофельного поля.

Например, проведение подобных исследований позволило установить агрегированный характер распределения *G. rostochiensis* на картофельных полях (рис. 16). Заражение растений нематодой проявляется в виде очагов, наиболее сильные из них локализованы в центре исследуемой площади и распространяются радиально к краям поля.

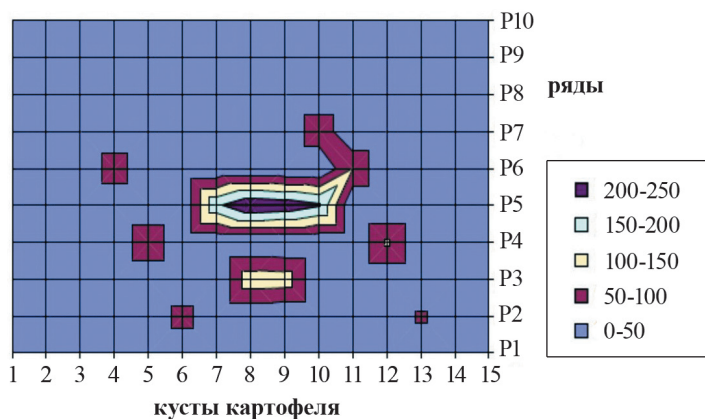


Рис. 16. Контурная карта горизонтального распределения цист *G. rostochiensis* по картофельному полю

Карта построена на основе численных данных при отборе почвенных проб с поля и определения количества цист при визуальном осмотре посадок картофеля (рис. 17).

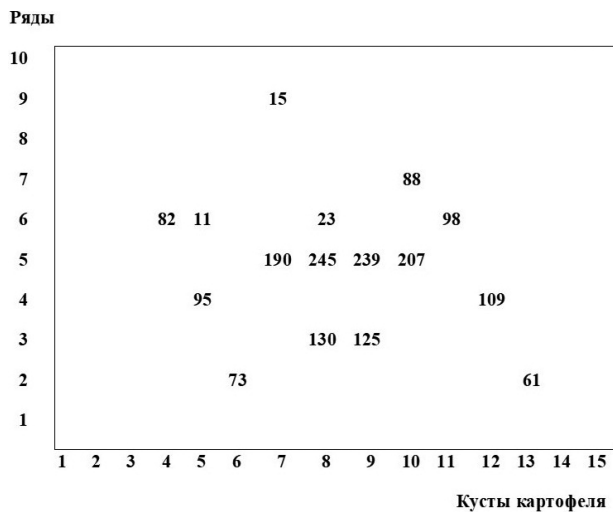


Рис. 17. Распределение цист *G. rostochiensis* по картофельному полю (обследование почвы из-под растений, имеющих признаки глободероза)

Абсолютные значения количества цист/яиц и личинок отдельных растений и почвы используются в анализе возможных причин формирования агрегированности паразита – исследование индивидуальных различий хозяев на заражение, неравномерность распределения паразитических личинок в природе, гетерогенность времени контакта паразита и хозяина, что в целом определяет различия в дозе заражения.

Выбор мероприятий по ограничению численности нематоды

Степень зараженности почвы цистообразующими нематодами определяется количеством цист или яиц и личинок, содержащихся в цистах. В случае картофельной цистообразующей нематоды *G. rostochiensis* высокая степень зараженности почвы – это свыше 5000 личинок в 100 см³ почвы (более 25 цист); средняя – до 5000 личинок (до 25 цист); низкая – менее 1000 личинок в 100 см³ почвы (менее 5 цист). При этом определение уровня инфицированности почвы картофельного поля необходимо в выборе адекватных мер по ограничению численности и вредоносности *G. rostochiensis* – выращивание нематодоустойчивых сортов картофеля, агротехнические приемы (севооборот, выращивание непоражаемых культур, нематодоустойчивых сортов, ранние сроки посадки и уборки сортов картофеля), применение нематодицидов, профилактические меры, включающие предупреждение заноса паразита на «чистые» поля (очистка и дезинфекция обуви, рабочей одежды и орудий труда дезинфицирующими растворами).

Оценка эффективности способов по ограничению численности нематоды

В случае, когда применяются те или иные методы борьбы с нематодой, проведение исследований уровня зараженности почвы в динамике вносит вклад в оценку эффективности выбранных методов.

Эффективность методов по ограничению численности нематоды и снижению инвазионной нагрузки на сельскохозяйственную

культуру в очагах глободероза оценивается сравнением плотности популяции нематоды в опыте (поле, на котором проводится какая-либо обработка) и контроле (поле, которое не подвергается воздействию мероприятий) через равные промежутки времени; при этом исходная плотность популяции нематоды не должна различаться. Возможно также сравнение пред- и послепосевной плотности популяции нематоды для разных условий (вариантов).

Необходимым условием для успешного контроля численности нематоды является соблюдение севооборота. Известно, что бессменное выращивание картофеля на одних и тех же участках в течение нескольких лет увеличивает вредоносность картофельной нематоды. Это наиболее актуально для приусадебных участков, так как совхозы и агрохозяйства широко практикуют севообороты и нематодоустойчивые сорта. Кроме того, производство картофеля все более концентрируется в индивидуальных и личных подсобных хозяйствах, которые стали основными производителями (до 92 % общего объема производства картофеля) (Анисимов, 2001).

Эффективно возделывание ранних сортов. В этом случае уменьшаются потери урожая, так как при ранней уборке паразит не успевает закончить свой жизненный цикл и дать потомство. Выращивание нематодоустойчивых сортов картофеля позволяет резко снизить зараженность почвы нематодой (Соловьева, 1974; Понин и др., 1978; Маковская, 1991). Инвазионные личинки привлекаются корневыми выделениями этих сортов в той же степени, что и восприимчивых, проникают в корни и погибают, не достигнув половой зрелости. В том случае, если личинки все же развиваются и дают потомство, то оно малочисленно, преимущественно самцы или самки, содержащие недоразвитые яйца. Важное практическое значение имеет правильный подбор сортов с учетом длительности периода вегетации, необходимого для их полного созревания, температурных условий и устойчивости к болезням.

Внесение в почву различных добавок (отходы деревообработки, морские водоросли и т. д.) играет роль в очищении почвы от паразитической нематоды. Например, внесение свежераздроблен-

ной коры сосны и ели характеризуется двойным эффектом: приводит к снижению численности паразита в 5–8 раз (Груздева и др., 1999; Матвеева, Груздева, 1999) и улучшает условия для развития растений на ранних этапах онтогенеза. Обработка почвы 10% раствором лигносульфоната натрия позволяет снизить численность личинок картофельной нематоды в 2 раза и интенсифицировать развитие растений, что подтверждается улучшением показателей роста и развития картофеля.

Современный подход к регуляции численности картофельной нематоды представляет попытку объединить все доступные мероприятия, способствующие в той или иной степени уничтожению паразита, снижению его инвазионного потенциала, удержанию плотности популяций ниже уровня вредоносности, другими словами, поддержанию уровня, безопасного для урожая культуры. Наиболее быстрые практические результаты могут быть получены на основе улучшения характеристик по признаку устойчивости к вредителям известных районированных сортов в результате применения новых технологий (применение температурных обработок растений перед высадкой в поле). Способы экологически безопасны для использования в практике сельского хозяйства, запатентованы, позволяют повысить устойчивость картофеля к нематоде и урожайность картофеля на инфицированных почвах.

Анализ динамики численности нематоды

Анализ динамики численности нематоды по годам вносит вклад в прогнозирование интенсивности развития глободероза. Динамика численности цистообразующих нематод может быть проанализирована как с точки зрения абсолютных значений количества цист, так и по коэффициенту размножения нематоды (k_r).

Оценка устойчивости растений к заражению

Уровень заражения растений отражает степень их поражаемости паразитом. По количеству цист на корнях растений можно проводить оценку устойчивости картофеля к нематоде. Существует

шкала для подобной оценки: 1-я группа растений – устойчивый сорт (0 цист/раст.); 2-я группа растений – слабопоражаемый (1–5 цист/раст.); 3-я группа – восприимчивый (свыше 6 цист/раст.). Особое значение это имеет для сельскохозяйственных исследований, а также в селекционном процессе. Так, например, применяя стандартную, или эталонную, популяцию картофельных цистообразующих нематод и сравнивая коэффициент размножения нематод на новом сорте с таковым коэффициентом на эталонном сорте, возможно отнести новый сорт к международно признанному уровню нематодоустойчивости.

ПОСЛЕСЛОВИЕ

Актуальность изучения фитопаразитических нематод определяется значимой ролью данной группы в биосферных процессах и деятельности человека – многие виды наносят существенный урон урожаю сельскохозяйственных культур, являются переносчиками непо- и тобра-групп вирусов, часть видов – карантинные объекты. Расширение ареалов некоторых специфичных паразитов растений вызывает необходимость осуществления мониторинга и установления закономерностей распространения видов фитопаразитических нематод. О высоком темпе изучения нематод в настоящее время свидетельствуют большое число международных научных мероприятий, основание специализированных научных журналов по нематологии, создание и активная работа международных нематологических обществ. Международные симпозиумы, проводимые Российским обществом нематологов, являются основным форумом нематологов России и стран СНГ.

Фитонематология – активно развивающаяся наука, использующая методы и подходы различных биологических дисциплин, как классические, так и современные. В рамках данного пособия среди всех многочисленных методов изучения фитопаразитических нематод, существующих на сегодняшний день, нами был приведен лишь необходимый минимум, служащий основой для дальнейшего исследования этой интересной и важной с практической точки зрения группы организмов.

Дополнительные сведения о методах сбора, выделения, идентификации нематод, а также другую полезную информацию можно получить из списка рекомендуемой литературы и интернет-ресурсов.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Определители фитопаразитических нематод

Крабль Э. Л. Паразитические корневые нематоды. Семейство Hoplolaimidae. Л.: Наука, Ленингр. отд., 1978. 420 с.

Парамонов А. А. Основы фитогельминтологии. Т. I. М.: Наука, 1962. 480 с.; Т. II. М.: Наука, 1964. 446 с.; Т. III. М.: Наука, 1970. 256 с.

Рысс А. Ю. Корневые паразитические нематоды семейства Pratylenchidae (Tylenchida) мировой фауны. Л.: Наука, 1988. 368 с.

Brzeski M. W. Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Museum and Institute of Zoology Polish Academy of Sciences. Warszawa, 1998. 397 p.

Siddiqi M. R. Tylenchida: Parasites of Plants and Insects. 2nd edition. Wallingford, UK: CABI Publishing. 2000. 833 p.

Картофельная цистообразующая нематода

Груздева Л. И., Матвеева Е. М. Расширение ареала картофельной цистообразующей нематоды на Северо-Западе России // Труды Центра паразитологии ИПЭЭ РАН. Т. 46: Биоразнообразие и экология паразитов. М.: Наука, 2010. С. 73–82.

Mulder A., van der Wal A. F. Relationship between potato cyst nematodes and their principal host. I. A literature review // Potato Research. 1997. Vol. 40. P. 317–326.

Subbotin S. A., Halford P. D., Perry R. N. Identification of populations of potato cyst nematodes from Russia using protein electrophoresis, rDNA-RFLPs and RAPDs // Russian Journal of Nematology. 1999. Т. 7, N 1. P. 57–63.

Методические руководства

Краткий спецкурс по нематологии: Учебно-методическое пособие / Е. М. Матвеева, А. А. Сушук, Е. П. Иешко (ред.). Петрозаводск: ПИН, 2011. 84 с.

Сысоева М. И., Матвеева Е. М., Лаврова В. В. и др. Физиолого-биохимические и паразитологические методы исследования зараженного нематодой растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 79 с.

van Bezooijen J. Methods and techniques for nematology. Wageningen: Wageningen University Press, 2006. 112 p.

Coyne D. L., Nicol J. M., Claudius-Cole B. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. 2nd edition. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (ИТА), Cotonou, Benin, 2014. 82 p.

Ryss A. Yu. The simplest «field» methods for extraction of nematodes from plants, wood, insects and soil, with additional description how to keep extracted nematodes alive for a long time // Паразитология. 2017. Т. 51, № 1. С. 57–67.

Ryss A. Y. A simple express technique to process nematodes for collection slide mounts // Journal of Nematology. 2017. Vol. 49 (1). P. 27–32.

Методы статистической обработки данных

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: Методическое пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию: Учеб. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2011. 302 с.

Научно-популярные издания

Циммер К. Паразиты. Тайный мир / Пер. с англ. Н. Лисовой. М.: Альпина нон-фикшн, 2011. 368 с.

Интернет-ресурсы

Информационный сайт Говарда Ферриса: <http://nemaplex.ucdavis.edu/Uppermnus/topmnu.htm>.

Интерактивные диагностические ключи для определения свободноживущих и фитопаразитических нематод: <https://nematode.unl.edu/index.html>.

Международная Федерация Нематологических Обществ – International Federation of Nematology Societies (IFNS): <http://www.ifns.org/home/>

Общие сведения о распространении нематод в Европе: Fauna Europaea <https://fauna-eu.org>.

Международные Нематологические курсы при Гентском университете, Бельгия (крупнейший в Европе центр по обучению нематологии): <http://www.pinc.ugent.be>.

Европейско-средиземноморская организация по защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization): <https://www.eppo.int>.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов Б. В. Сортовые ресурсы и качество семенного картофеля. М., 2001. 108 с.

Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Коваленко Т. Е., Лай Г. Н. О регуляции численности картофельной нематоды в агроценозах Карелии // Вестн. Российской Академии с.-х. наук. 1999. № 2. С. 41–44.

Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Суцук А. А. Разнообразие фауны нематод естественных биоценозов Карелии // Нематоды естественных и трансформированных экосистем: Сб. науч. ст. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. С. 54–56.

Деккер Х. Нематоды растений и борьба с ними. М.: Колос, 1972. 444 с.

Иванова Т. С. Паразитические корневые нематоды. Семейство Criconematidae. Л.: Наука, 1976. 180 с.

Кирьянова Е. С., Кралль Э. Л. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними. Т. 1. Л.: Наука, 1969. 443 с.; Т. 2. Л.: Наука, 1971. 522 с.

Маковская С. А. Локализация очагов золотистой картофельной нематоды // Защита растений. 1991. № 7. С. 50–51.

Матвеева Е. М. Диагностика цистообразующих нематод рода *Globodera* (Nematoda: Tylenchida) // Паразитические нематоды растений и насекомых. М.: Наука, 2004. С. 119–136.

Матвеева Е. М., Груздева Л. И. Влияние коры хвойных деревьев на вылупление личинок картофельной нематоды // Вестн. Российской Академии с.-х. наук. 1999. Вып. 3. С. 34–36.

Понин И. Я., Пантюхина Л. А., Тимофеев Н. Н. Перспективы выведения гетеродероустойчивых сортов картофеля в Белоруссии // Материалы симпозиума «Борьба с картофельной нематодой». Тарту, 1973. С. 33.

Соловьева Г. И. Нематоды овощных и кормовых культур. Петрозаводск: Карелия, 1974. 51 с.

Соловьева Г. И., Васильева А. П., Груздева Л. И. Свободноживущие и фитопаразитические нематоды северо-запада СССР. Л.: Наука, Ленингр. отд., 1976. 107 с.

Соловьева Г. И., Потаевич Е. В., Богданова А. П. и др. Физиология глободерорезистентности картофеля. Л.: Наука, 1989. 134 с.

Таболин С. Б., Романенко Н. Д., Митюшев И. М. Агронематология: Учебное пособие / Под общей ред. С. Б. Таболина. М.: РГАУ-МСХА, 2017. 200 с.

Фитопаразитические нематоды России / Под ред. С. В. Зиновьевой, В. Н. Чижова. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. 386 с.

Чесунов А. В. Биология морских нематод. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 367 с.

Andrassy I. A short consensus of free-living nematodes // Fundamental and Applied Nematology. 1992. Vol. 15. P. 187–188.

Bardgett R. D., Cook R., Yeates G. W., Denton C. S. The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems // Plant and Soil. 1999. Vol. 212. P. 23–33.

van Bezooijen J. Methods and techniques for nematology. Wageningen, Netherlands: Wageningen Univ. Press, 2006. 112 p.

Bongers T. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition // Oecologia. 1990. Vol. 83. P. 14–19.

Bongers T., Korthals G. The behaviour of maturity index and plant parasite index under enriched conditions // Nematologica. 1995. Vol. 41. P. 286.

Brzeski M. W. Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Museum and Institute of Zoology Polish Academy of Sciences. Warszawa, 1998. 397 p.

Christoforou M., Pantelides I. S., Kanetis L. et al. Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide // Plant Pathol. 2014. Vol. 63. P. 1185–1192.

Ebrahimi N., Viaene N., Moens M. Optimizing trehalose-baessed quantification of live eggs in potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) // Plant Dis. 2015. Vol. 99. P. 947–953.

Holterman M., Rybarczyk K., van den Elsen S. et al. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades // Molecular Biology and Evolution. 2006. Vol. 23. P. 1792–1800.

LaMondia J. A., Rawsthorne D., Brodie B. B. Methods for reducing experimental variation in *Globodera rostochiensis* // Journal of Nematology. 1986. Vol. 18, N 3. P. 415–418.

Nematodes as environmental indicators / Ed. by M. J. Wilson, T. Kakouli-Duarte. Wallingford, UK: CAB International, 2009. 326 p.

Nicholas K. B., Nicholas H. B. GenDoc: A tool for editing and annotating multiple alignments, version 2.5. 1997.

OEPP/EPPO. PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2017. Vol. 47, N 2. P. 174–197.

Ogiga I. R., Estey R. H. The use of Meldola Blue and Nile Blue A, for distinguishing dead from living nematodes // Nematologica. 1974. Vol. 20. P. 271–276.

Seinhorst J. W. Methods for the extraction of *Heterodera* cysts from not previously dried soil samples // Nematologica. 1964. Vol. 10. P. 87–94.

Shepherd A. M. The emergence of larvae from cysts in the genus *Heterodera*. CAB, Bucks, UK, 1962. 90 p.

Siddiqi M. R. Tylenchida. Parasites of plants and insects. Common wealth Institute of Parasitology. United Kingdom. 1986. 646 p.

Siddiqi M. R. Tylenchida: Parasites of plants and insects. 2nd edition. Wallingford, UK: CABI Publishing. 2000. 833 p.

Smant G., Govere A., Stokkermans J. P. et al. Potato root diffusate-induced secretion of soluble, basic proteins originating from the subventral esophageal glands of potato cyst nematodes // Phytopathology. 1997. Vol. 87, N 8. P. 839–845.

Smol N., De Ley P., De Ley I. T. Techniques. International nematology course. Gent: Gent University, 1999. P. 3–12.

Talavera M., Jimenez A. T. Plant parasitic nematodes from unirrigated fields in Alhama, Southeastern Spain // Nematologia Mediterranea. 1997. Vol. 25, N 1. P. 73–81.

Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. Multiple Alignment Using ClustalW and ClustalX // Current Protocols in Bioinformatics. 2002.

Twomey U., Warrior P., Kerry B. R., Perry R. N. Effects of the biological nematicide, DiTera, on hatching of *Globodera rostochinensis* and *G. pallida* // Nematology. 2000. Vol. 2. P. 355–362.

Viketoft M., Palmborg C., Sohlenius B. et al. Plant species effects on soil nematode communities in experimental grasslands // Applied Soil Ecology. 2005. Vol. 30. P. 90–103.

На обложке сверху:

- изготовление микропрепаратов (отлов нематод из суспензии с помощью бинокля);
- головной отдел тела фитопаразитической нематоды *Nagelus leptus*;
- опытный участок с посадками картофеля;
- окрашенные корни картофеля для выявления личинок *Globodera rostochiensis*.

На обложке внизу:

- пробоотборник с почвенным образцом;
- цисты *Globodera rostochiensis* после выделения из почвы;
- визуализация (изображение) фитопаразитических нематод с микропрепарата с помощью системы VIDI-CAM;
- пробирки с зафиксированными нематодами (суспензии) после выделения из почвенных образцов;
- головной отдел тела фитопаразитической нематоды *Hemicycliophora canida*;
- мини-клубни картофеля, подготовленные к опыту.

На обложке представлены фото авторов пособия.

Научное издание

Матвеева Елизавета Михайловна
Сущук Анна Алексеевна
Калинкина Дарья Сергеевна
Займль-Бухингер Виктория Витальевна

**Методические основы изучения
фитопаразитических нематод**

Учебно-методическое пособие

*Печатается по решению Ученого совета
Института биологии КарНЦ РАН*

Редактор Л. В. Кабанова
Оригинал-макет Н. Н. Сабанцева

Подписано в печать 19.09.2018. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$.
Гарнитура Times. Уч.-изд. л. 2,6. Усл. печ. л. 3,60.
Тираж 150 экз. Заказ № 509

Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50